

(19)



(10) **LT 5153 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5153**
- (21) Paraiškos numeris: **2003 107**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2003 12 17**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2004 05 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2004 08 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US02/16464**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2002 05 21**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2003 12 17**
- (30) Prioritetas: **60/292.423, 2001 05 21, US**
- (72) Išradėjas:
John S. PATTON, US
Mei Chang KUO, US
Milton J. HARRIS, US
Chester LEACH, US
Kimberly PERKINS, US
Blaine BUECHE, US
- (73) Patento savininkas:
NEKTAR THERAPEUTICS, 150 Industrial Road, San Carlos, California 94070, US
NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION, 490 Discovery Drive, Huntsville, Alabama 35806, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Marius JAKULIS - JASON, AAA, Rūdninkų g. 18/2, LT-01135 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:

Chemiškai modifikuoto insulino įvedimas į plaučius

- (57) Referatas:

Šis išradimas pateikia aktyvius, hidrofilinius, polimeru modifikuotus insulino darinius. Vienu aspektu insulino dariniai tinka įvedimui į plaučius, ir demonstruoja farmakokinetines ir/arba farmakodinamines savybes, kurios yra žymiai geresnės, nei natyvaus insulino.

Išradimo sritis

Šis išradimas nukreiptas į bioaktyvų hidrofiliniu polimeru modifikuotą insulino darinį, skirtą įvesti į plaučius inhaliuojant. Taip pat pateikiami tokio darinio gavimo bei įvedimo būdai.

Išradimo prielaidos

Insulinas yra polipeptidinis hormonas, gaminamas sveikų (ne diabetikų) individų kasos beta-ląstelėse. Žmogaus insulinas yra 51 aminorūgšties polipeptidinis hormonas, kurio molekulinė masė apie 5800 daltonų. Insulino molekulė sudaryta iš dviejų peptidinių grandinių (A ir B grandinės), turinti vieną intrasubvienetą ir du disulfidinius ryšius tarp subvienetų. A grandinę sudaro 21 aminorūgštis, tuo tarpu B grandinę – 30 aminorūgščių. Dvi insulino grandinės sudaro gerai organizuotą struktūrą su keliomis α -spiralių sritimis tiek A, tiek B grandinėje. Įdomu, kad izoliuotos insulino grandinės yra neaktyvios. Tirpale insulinas gali egzistuoti kaip monomeras arba kaip dimeras, arba kaip heksameras. Insulinas yra heksamerinis labai koncentruotuose preparatuose, naudojamuose subkutaninėje terapijoje, tačiau tampa monomeru prasiskiedus kūno skysčiuose. Insulinas reikalingas karbohidratų metabolizmo reguliavimui, sumažinant gliukozės kiekį kraujyje; sisteminis insulino trūkumas sąlygoja diabetą. Diabetinių pacientų išgyvenimas priklauso nuo dažno ir ilgalaikio insulino įvedimo, palaikant priimtinius gliukozės kiekius kraujyje.

Dabartinės insulino vaisto formos turi tą trūkumą, kad gali sukelti rimtas medicininės komplikacijas gydant diabetą. Pavyzdžiui, standartinis cinko insulino preparatas, dažniausiai naudojamas diabetikų, egzistuoja neaktyvaus heksamerinio insulino kristalų suspensijos pavidale. Mikrokristalų ištirpinimas ir po to heksamero disociacija į aktyvią monomerinę formą gali sąlygoti uždelstą ir individualiai skirtingą insulino absorbciją kraujyje (F.Liu et al., *Bioconjugate Chem.*, 8, 664-672 (1997); T.Uchio et al., *Adv. Drug Del. Rev.*, 35, 289-306 (1999); K.Hinds et al., *Bioconjugate Chem.*, 11, 195-201 (2000)). Insulino vaisto formos taip pat nukenčia dėl fizinio nestabilumo, kadangi insulinas turi tendenciją sudaryti skaidulas ir netirpias nuosėdas. Nuosėdos yra ypač problematiškos

vaisto formose, kurios turėtų būti naudojamos insulino siurbliuose. Insulinas vaisto formoje taip pat yra neatsparus cheminei degradacijai, pvz., nefermentiniam deamidinimui ir didelės molekulinės masės transformacijos produktų susidarymui, tokių kaip kovalentiniai insulino dimerai (Brange, J., *et al.*, *Pharm. Res.*, 9, 715-726 (1992); Brange, J., *et al.*, *Pharm. Res.*, 9, 727-734 (1992)). Yra svarių argumentų už tai, kad imunologinio atsako insulinui atvejai gali būti sąlygoti šių kovalentinių insulino agregatų buvimo (Robbins, D.C., *et al.*, *Diabetes*, 36, 838-841 (1987)). Tačiau netgi labai švarus žmogaus insulinas yra šiek tiek imunogeniškas (Kim, *ibid.*).

Be aukščiau paminėtų vaisto formos nestabilumo problemų, egzistuoja daug trūkumų, susijusių su dabartine insulino terapija vaisto įvedimo požiūriu. Insulinas dažniausiai įvedamas subkutaninės injekcijos būdu, tipiniu atveju į pilvą arba viršutinę šlaunies dalį. Insulinas gali būti įvestas taip pat intraveniniu būdu arba į raumenis. Siekiant palaikyti priimtina kraujo gliukozės kiekį, dažnai reikia leisti insuliną bent kartą arba du kartus per dieną, pagal reikalą įvedant papildomas insulino injekcijas. Agresyvus diabeto gydymas gali pareikalaus netgi dažnesnių injekcijų, kai pacientas stebi kraujo gliukozės kiekį naudodamasis namų diagnostinį rinkinį. Insulino įvedimas injekcijomis yra nepageidautinas daugeliu aspektų. Pirmiausia, daugeliui pacientų sunku ir sudėtinga daryti injekcijas tokiu dažniu, kokio reikia priimtino gliukozės kiekio kraujyje palaikymui. Faktiškai, daugelis 2 tipo pacientų metų metais vengia insulino dėl adatos baimės. Toks prieštaravimas gali sąlygoti gydymo nesilaikymą, kas rimčiausiais atvejais gali būti grėsmė gyvybei. Be to, sisteminė insulino absorbcija iš subkutaninės injekcijos yra santykinai lėta, dažnai reikalauja 45-90 minučių, netgi kai naudojama greitai veikianti insulino vaisto forma. Taigi, egzistuoja poreikis pateikti alternatyvias vaisto formas bei įvedimo būdus, kurie išvengtų injekcijų sau ir kurie užtikrintų greitą sisteminių insulino įsisavinimą.

Tyrinėta daug neinjekuojamų vaisto formų, tokios kaip peroralinė ir nazalinė, tačiau kaip šių pastangų rezultatas nebuvo sukurta jokia komerciškai vertinga peroralinė ar nazalinė įvedimo sistema insulinui (Paston, *et al.*, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 1, 35 (2-3), 235-247 (1999)), pagrinde dėl labai žemo ir skirtingo bioprieinamumo (Hilsted, J., *et al.*, *Diabetologia* 38, 680-684, 1995)). Nors bioprieinamumą gali padidinti absorbcijos sustiprintojai, šie agentai gali pažeisti gleivinę.

Tačiau dabar sukurtos inhaliuojamos insulino vaisto formos, kurios, atrodo yra daug žadančios sprendžiant daugumą aukščiau paminėtų problemų. Pavyzdžiui, patentas US

5997848 (Patton *et al.*, Inhale therapeutis Systems, Inc.) aprašo insulino sausų miltelių vaisto formą, kuri (i) yra chemiškai ir fiziškai stabili kambario temperatūroje, ir (ii) įkvėpus, greitai absorbuojasi per alveolių srities epitelio ląsteles į kraujotakos sistemą. Ten aprašyti greito veikimo insulino vaisto formos ir būdai leidžia išvengti varginančių injekcijų ir trijų mėnesių trukmės efektyvumo žmonėms studijose pasirodė užtikrinantys ekvivalentišką gliukozės kiekio kontrolę I ir II tipo nuo insulino priklausomiems diabetikams, lyginant su subkutaninėmis injekcijomis (Patton *et al.*, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 1, 35 (2-3), 235-247 (1999)). Sausų miltelių insulino vaisto formos, aprašytos Patton *et al.*, sprendžiant vaisto formos nestabilumo bei paciento nepalankumo problemas, vis dėlto reikalauja dažno (pvz., su valgiu) insulino inhaliavimo, kad gliukozės kiekio kontrolė būtų efektyvi. Be to, tipiškas šio tipo insulino dozavimo režimas greitai veikiančio inhaliuojamo insulino pagrindu vis tiek reikalauja vienos ilgai veikiančio insulino injekcijos nakčiai I tipo diabetikams ir kai kuriems II tipo diabetikams. Taigi vis dar egzistuoja poreikis turėti aktyvias, tirpias, stabilias insulino formas, reikalaujančias retesnio dozavimo, t.y., egzistuoja ilgai veikiančio insulino vaisto formų, geriau, inhaliuojamų, poreikis.

Ilgai veikiančio insulino vaisto formos geriausiai yra apibūdinamos kaip turinčios labai lėtą veikimo pradžią ir ilgai trunkančią, palyginti plokščią veikimo smailę. Dabartinės ilgai veikiančios injekcinės insulino vaisto formos, t.y. ultralentas (ilgai veikianti insulino cinko suspensija) ir protamino cinko insulino suspensija, yra toli gražu nepatenkinami. Šios vaisto formos yra linkę padidinti, o ne užtikrinti žemą bazinę insulino koncentraciją, yra nenuspėjamos, ir paprastai demonstruoja ne ilgesnį nei vienos dienos veikimą. Ilgas ultralento insulino veikimo puslaikis apsunkina optimalios dozės ribų nustatymą, tuo tarpu protamino cinko insulinas yra retai naudojamas dėl savo nenuspėjamos ir ilgai trunkančios veikimo eigos (Goodman & Gilman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Ed., Hareman and Limbird, eds, 1996, p. 1500). Kitos ilgai veikiančio injekuojamo insulino vaisto formos, kurios buvo nesėkmingai tyrinėtos, apima su albuminu surišią insuliną ir kobalto-insulino heksamerines vaisto formas (Hoffman, A., Ziv E., *Clin. Pharmacokinet*, 33(4):285-301 (1997)).

Daug kitų ilgai veikiančio insulino vaisto formų taip pat buvo tiriamos. Į šias vaisto formas įeina liposomos, turinčios didelį lipidų perteklių insulino atžvilgiu (Liu. F-Y, *et al.*, *Pharm. Res.* 10, 228-232, (1993)), poringos poly(pieno rūgšties ir glikolio rūgšties

kopolimeras) (PLGA) insulino dalelės (Edwards, D.A., *et al.*, *Science* 276(5320), 1868-1871 (1997)), purškiamos PLGA nanosferos (Kawashima, Y., *et al.*, *J. Controlled Release*, 62(1-2): 279-287 (1999)) ir fosfolipido/protamino insulino vaisto formos (Vanbever, R., *et al.*, *Proc. Control Rel. Bioact. Mater.* 25, 261-262 (1998)). Deja, visos šios vaisto formos pasirodė netinkamos dėl žemo bioprieinamumo išbandžius su žiurkėmis arba dėl vaisto formos netobulumo. Taigi, seniai egzistuoja poreikis optimaliai ilgo poveikio insulino vaisto formai, kuri būtų bioaktyvi, fiziškai ir chemiškai stabili, tirpi vandenyje ir, pageidautina, monomerinė. Idealiu atveju tokia vaisto forma būtų tinkama įvedimui į plaučius.

Išradimo santrauka

Vienu aspektu dabartinis išradimas yra paremtas insulino kompozicijomis, skirtomis įvedimui į sisteminę kraujo apytaką per gilųjį plautį. Tiksliau sakant, išradimo kompozicijos apima insulino konjugatą, kovalentiškai sujungtą su viena ar daugiau negamtinio hidrofilinio polimero molekulių. Pageidaujame įgyvendinime, negamtinis hidrofilinis polimeras, kovalentiškai sujungtas su insulinu yra polialkileno glikolis, toks kaip polietileno glikolis (PEG), nors visi toliau šioje apibrėžtyje išdėstyti įgyvendinimai gali būti pritaikyti kitiems negamtiniams hidrofiliniams polimerams.

Apskritai, išrastas insulino-polimero konjugatas rodo geresnes farmakokinetines ir farmakodinamines savybes, lyginant su natyviu insulinu, ypač įvedus į plaučius. Vienam įgyvendinime, čia pateikti PEG-insulino konjugatai pademonstravo gerą absoliutų bioprieinamumą, įvedus į plaučius ir į giliuosius plaučius. Ypatingame įgyvendinime, išrastas PEG-insulino konjugatas yra apibūdinamas absoliučiu bioprieinamumu įvedus į plaučius, kuris yra netgi didesnis už natyvaus insulino. Pageidautina, kad išrastas PEG-insulino konjugatas turėtų absoliutų bioprieinamumą, įvedus į plaučius, kuris būtų mažiausiai 1,5-2 kartus didesnis nei natyvaus insulino. Dar labiau pageidautiname įgyvendinime, PEG-insulino konjugatas pagal šį išradimą apibūdinamas absoliučiu bioprieinamumu, įvedus į plaučius, kuris yra didesnis nei apie 15%, dar labiau pageidautina, didesnis nei apie 20%, arba labiausiai pageidautina, didesnis nei apie 30%.

Dar viename įgyvendinime, išrastas PEG-insulino konjugatas, įvedus į plaučius, parodo T_{max} (laiką, reikalingą pasiekti maksimalią koncentraciją), kuris yra mažiausiai

1.5 karto didesnis nei natyvaus insulino, labiau pageidautina 2 arba 3 kartus, arba labiausiai pageidautina 5 kartus didesnis, nei natyvaus insulino.

PEG, naudojamas išradimo junginiuose, gali turėti keletą skirtingų savybių. Viena išradimo įgyvendinime, PEG-insulino konjugato polietilenglikolio dalis, kaip čia aprašyta, grandinės gale baigiasi inertiška arba nereaktyvia terminaline grupe, tokia kaip alkoksi grupė arba tiksliau kalbant metoksi grupė.

Alternatyviame įgyvendinime, konjugato polietilenglikolio dalis turi struktūrą, ypatingai tinkančią insulino prijungimui, įskaitant linijinius polietilenglikolius ir daug šakų turinčios grandinės arba šakotos grandinės polietilenglikolius. Dar kitame įgyvendinime PEG-insulino konjugatas gali apimti dvi po vieną funkciją derivatizuotas insulino molekules, sujungtas di-aktyvintu polietilenglikoliu (insulinas-PEG-insulinas). Kitu atveju, insulino molekulė savo "hantelio" struktūroje gali būti toliau modifikuota papildomais PEG.

Kitame įgyvendinime išradimo PEG-insulino konjugatas apima dvišakį polietilenglikolį, turintį šakotą fragmentą polimerinės grandinės viename gale ir dvi (arba dviejų kartotinio) laisvas reaktyvias grupes, prijungtas prie šakoto fragmento kovalentiniam insulino prijungimui. Šiame išradimo įgyvendinime, šakota polietilenglikolio struktūra leidžia prijungti polimerų grandinę prie dviejų ar daugiau insulino molekulių.

Polietilenglikolis kaip išradimo insulino konjugato dalis gali pasirinktinai turėti vieną ar daugiau suskaidomų jungčių.

Paprastai, insulinas yra kovalentiškai sujungtas su PEG per jungiantį tiltelį, kuris yra PEG gale. Pageidautini jungiantys tilteliai, naudojami išradime, apima tinkančias konjugavimui su reaktyviu insulino amino grupes, tokias kaip N-hidroksisukcinimido aktyvūs esteriai, aktyvūs karbonatai, aldehydai ir acetaliai.

Dar kitame įgyvendinime, PEG, kovalentiškai sujungtas su insulino išradimo konjugate, susideda iš nuo apie 2 iki apie 300 sub-vienetų (OCH_2CH_2), pageidautina nuo 4 iki 200 sub-vienetų, o dar labiau pageidautina nuo apie 10 iki 100 sub-vienetų.

Alternatyviame įgyvendinime, PEG, kovalentiškai sujungto su insulino nominali vidutinė molekulinė masė yra nuo apie 200 iki apie 10,000 daltonų. Pageidautiname įgyvendinime, PEG nominali vidutinė molekulinė masė yra nuo apie 200 iki 5000 daltonų.

Dar labiau pageidautiname įgyvendinime, PEG nominali vidutinė molekulinė masė yra nuo apie 200 iki 2000 daltonų arba nuo apie 200 iki 1000 daltonų.

Ypatingame įgyvendinime, konjugate esanti insulino dalis apima natyvų žmogaus insuliną.

Dar kitame įgyvendinime, išradimo kompozicijos konjugatas turi didesnę nei apie 90% grynumą (t.y. konjugato struktūros dalis 90% ar daugiau pagal masę susideda iš vieno ar daugiau PEG-insulino). Tai reiškia, kad išradimo kompozicijos gali būti apibūdintos dideliu konjugato insulino komponentų grynumo laipsniu, t.y., struktūra neturi juntamo laisvojo polietilenglikolio rūšių ar kitų su PEG susijusių priemaišų kiekio.

Viename įgyvendinime, išradimo kompozicija susideda iš konjugato, kuriame insulinas yra kovalentiškai prijungtas prie PEG per savo vieną ar daugiau amino grupių. Išradimo kompozicijoje esantis insulinas gali būti mono-pakeistas (t.y., turintis tik vieną kovalentiškai prijungtą PEG). Ypatingas atitinkantis išradimą mono-pakeistas PEG-insulino konjugatas apima polietileno glikolio fragmentą, kovalentiškai prijungtą prie insulino molekulės vietos, parinktos iš grupės, susidedančios iš PheB1, GlyA1 ir LysB29.

Pageidaujame įgyvendinime, PEG fragmentas yra kovalentiškai prijungtas prie insulino PheB1 vietos. Viename įgyvendinime, mažiausiai maždaug 75% B-1Phe vietų insuline yra kovalentiškai prijungtos prie PEG.

Išradimo kompozicijos taip pat gali apimti mono-konjuguoto ir di-konjuguoto PEG insulino mišinį, turintį bet kurią ar daugiau aukščiau aprašytų savybių. Tokios kompozicijos gali apimti ir tri-konjuguotą PEG insuliną.

Alternatyviame įgyvendinime, atitinkantis išradimą PEG insulino konjugatas yra apibūdinamas proteolizės greičiu, kuris yra mažesnis, lyginant su nepegilintu ar natyviu insulinu.

Šio išradimo kompozicija taip pat gali apimti PEG-insulino konjugato ir nechemiškai modifikuoto arba natyvaus insulino mišinį.

Taip pat apimama aukščiau aprašyta kompozicija aerosolinėje formoje.

Išradimo kompozicijos gali būti ištirpintos ar suspenduotos skystame arba sausame pavidale, ir gali papildomai turėti farmaciniu požiūriu priimtina užpildą.

Taip pat čia pateikiamas bioaktyvaus polietilenglikolio insulino konjugatas, tinkantis įvedimui i giliuosius plaučius inhaliuojant.

Dar kitu aspektu išradimas pateikia PEG insulino konjugato įvedimo žinduoliams, esant reikalui, metodą, įvedant anksčiau aprašytą aerosolinę PEG insulino kompozicijos formą inhaliuojant.

Išradimas pateikia kitą aspektą, metodą, kuris leidžia pateikti iš esmės neimunogeninę insulino kompoziciją, tinkančią įvedimui į plaučius. Šis metodas apima insulino kovalentišką sujungimą su viena ar daugiau čia aprašyto negamtinio hidrofilinio polimero molekulių, bei kompozicijos įvedimą į plaučius inhaliuojant, ko pasėkoje insulinas per plaučius patenka į kraujo apytaką.

Dar vienu aspektu, yra pateiktas ilgalaikio poveikio insulino kompozicijos, skirtos įvedimui į žmogaus plaučius, gavimo būdas. Būdas apima insulino kovalentišką prijungimą prie vienos ar daugiau negamtinio hidrofilinio polimero molekulių, kas duoda kompoziciją, kuri apima insulino-hidrofilinio polimero konjugatą, ir kompozicijos įvedimą į plaučius inhaliuojant. Po įvedimo insulinas per plaučius patenka į kraujo apytaką ir aukštesnis kraujyje esančio insulino kiekis yra išlaikomas mažiausiai 8 valandas nuo įvedimo.

Išradimo PEG insulino konjugatas, aerosolizuotas ir įvestas inhaliuojant, yra naudingas diabeto (DM) gydyme.

Šie ir kiti išradimo objektai ir požymiai taps aiškesni perskaičius sekantį detalųjį aprašymą.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig. 1 yra pavyzdinio PEG-insulino konjugato ("750-2 PEG-insulinas") fermentinio skaidymo greičio kreivė, lyginant su nemodifikuoto insulino kontrole, kaip aprašyta 6 pavyzdyje.

Fig. 2 yra serumo insulino vidutinių koncentracijų kreivė, įvedus pavyzdinio PEG-insulino konjugato (5K PEG-insulinas") kompoziciją, lyginant su nepegilinto insulino kompozicija (detalės pateiktos 7 pavyzdyje).

Fig. 3 yra gliukozės vidutinių koncentracijų kraujyje kreivė, įvedus pavyzdinio PEG-insulino konjugato (5K PEG-insulinas") kompoziciją, lyginant su nepegilinto insulino kompozicija (detalės pateiktos 7 pavyzdyje).

Fig. 4 yra serumo insulino vidutinių koncentracijų kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (150 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$, 5K PEG insulinas), lyginant su nepegilintu insulinu (40 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$) (8 pavyzdys).

Fig. 5 yra gliukozės vidutinių koncentracijų kraujyje kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (150 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$, 5K PEG insulinas), lyginant su nepegilintu insulinu (40 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$) (8 pavyzdys).

Fig. 6 yra serumo insulino vidutinių koncentracijų kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (750-1 PEG insulinas), lyginant su nepegilintu insulinu (9 pavyzdys).

Fig. 7 yra gliukozės vidutinių koncentracijų kraujyje kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (750-1 PEG insulinas), lyginant su nepegilintu insulinu (9 pavyzdys).

Fig. 8 yra serumo insulino vidutinių koncentracijų kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (750-1 PEG insulinas, 80 ir 160 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$), lyginant su nepegilintu insulinu (80 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$) (10 pavyzdys).

Fig. 9 yra gliukozės vidutinių koncentracijų kraujyje kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (750-1 PEG insulinas, 80 ir 160 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$), lyginant su nepegilintu insulinu (80 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$) (10 pavyzdys).

Fig. 10 yra serumo insulino vidutinių koncentracijų kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (750-1 PEG insulinas, 80 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$), lyginant su nepegilintu insulinu (80 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$) (11 pavyzdys).

Fig. 11 yra gliukozės vidutinių koncentracijų kraujyje kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (750-1 PEG insulinas, 80 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$), lyginant su nepegilintu insulinu (80 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$) (11 pavyzdys).

Fig. 12 yra gliukozės vidutinių koncentracijų kraujyje kreivė, intratrachėjiniu būdu instiliavus žiurkių patinėliams pegilintą insuliną (2K PEG insulinas, 300 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$, 600 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$, 900 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$, 1200 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$), lyginant su nepegilintu insulinu (80 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$) (12 pavyzdys).

Fig. 13 yra serumo insulino vidutinių koncentracijų kreivė, įvedus intraveniniu būdu pegilinto (2K PEG) insulino pavyzdinę kompoziciją, lyginant su nepegilintu insulinu (detalės pateiktos 13 pavyzdyje).

Fig. 14 yra gliukozės vidutinių koncentracijų kraujyje kreivė, įvedus intraveniniu būdu pegilinto (2K PEG) insulino pavyzdinę kompoziciją, lyginant su nepegilintu insulinu (detalės pateiktos 13 pavyzdyje).

Detalus išradimo aprašymas

Įvairių tipišκών PEG insulino konjugatų struktūra, sintezė bei charakteristikos buvo optimizuoti įvedimui į plaučius. Nors PEG insulino molekulių gavimas buvo aprašytas anksčiau, kovalentinis PEG prijungimas ilgalaikio poveikio įkvepiamo insulino vaisto formoms nebuvo parodytas. Šiuo atžvilgiu sunkumai, su kuriais susidūrė pareiškėjas, buvo pateikti PEG insulino konjugatą, turintį optimalių skaičiaus, vietos, struktūros ir molekulinės PEG grandinių, prijungtų prie insulino molekulės, masės balansą, kad gautų insulino kompozicijas, tinkamas įvedimui į sisteminę apytaką, pageidautina per giliuosius plaučius. Stebėtina, remiantis aukščiau paminėtais dalykais, išradėjai atrado tam tikras PEG-modifikuotas insulino vaisto formas, turinčias vieną ar daugiau iš sekančių savybių: (i) kurios yra bioaktyvios, t.y., parodo mažiausiai 5% natyvaus insulino aktyvumo, arba pageidautinai turinčios bioaktyvumą, kuris iš esmės yra išlaikomas toks pat arba minimaliai mažesnis nei natyvaus insulino, arba dar labiau pageidautina, turinčios geresnį bioaktyvumą nei natyvus insulinas, (ii) kurios yra absorbuojamos iš plaučių į kraujotakos sistemą (o ne "prikimba" plaučiuose), (iii) kurios yra chemiškai ir fiziškai stabilios, (iv) kurios, įvedus į plaučius, pasiekia insulino kiekį kraujyje, kuris yra virš foninio mažiausiai 8 valandas po įvedimo, (v) kurios yra atsparios fermentinėms insuliną skaidančių fermentų atakoms ir (vi) kurios pasižymi gyvavimo puslaikiais, kurie yra ilgesni nei nepegilinto insulino, įvedus inhaliuojant, kas bus akivaizdu toliau skaitant sekantį aprašymą.

I. Apibrėžimai

Išradimo aprašyme naudojami terminai turi toliau nurodytas reikšmes.

Patikslinimuose ir papildymuose naudojamos vienaskaitinės formos apima ir daugiskaitos referentus, išskyrus kai kontekstas aiškiai diktuoja kitaip.

"Insulino" naudojamo šiame aprašyme reikšmė apima proinsuliną ir bet kokią išgrynintą išskirtą polipeptidą, turintį dalį arba visą pirminę struktūrinę konformaciją (tai

reiškia, vientisą aminorūgščių seką) ir turintį mažiausiai vieną iš biologinių gamtinio insulino savybių. Apskritai, termino “insulinas” reikšmė apima gamtinį ir sintetinės kilmės insuliną, apimant glikoformas bei analogus ir polipeptidus, turinčius vieną ar daugiau aminorūgšties modifikaciją (ištrynimą, įterpimą ar pakeitimą), kurių mastas iš esmės leidžia išlaikyti mažiausiai 80% ar daugiau gydomojo aktyvumo, palyginus su pilnu insulinu (prieš chemines modifikacijas su hidrofiliniu, negamtiniu polimeru kaip aprašyta šiame aprašyme). Dabartinio išradimo insulini gali būti pagaminti standartiniu būdu, apimant, bet neapribojant kasos ekstrakciją, rekombinantinę ekspresiją bei *in vitro* polipeptidinę sintezę. Natyvus arba laukinio tipo insulinas reiškia insuliną, turintį aminorūgščių seką, atitinkančią gamtoje randamo insulino aminorūgščių seką. Natyvus arba laukinio tipo insulinas gali būti natūralus (t.y. išskirtas iš gamtinio šaltinio) arba susintetintas.

“Fiziologiškai suskaidomas” arba “degraduojamas” ryšys yra silpnas ryšys, kuris reaguoja su vandeniu (t.y., yra hidrolizuojamas), esant fiziologinėms sąlygoms. Pageidautini ryšiai, kurių hidrolizės vandenyje, esant pH 8, 25 °C, puslaikis yra mažiau nei 30 minučių. Ryšio polinkis hidrolizuotis vandenyje priklauso ne tik nuo bendro jungties tipo, jungiančio du centrinius atomus, bet taip pat nuo pakaitų, prijungtų prie centrinių atomų. Atitinkamos hidrolitiškai nestabilios arba silpnos jungtys apima, bet neapsiriboja karboksilato esteriu, fosfato esteriu, anhidridais, acetaliais, ketaliais, aciloksialkilo eteriu, iminiais, ortoesteriais, peptidais ir oligonukleotidais.

“Hidrolitiškai stabilus” ryšys arba jungtis nurodo cheminį ryšį, paprastai kovalentinį, kuris yra iš esmės stabilus vandenyje, tai reiškia, fiziologinėmis sąlygomis nepatiria jokios pastebimos hidrolizės per ištęstą laiko tarpą. Hidrolitiškai stabilių jungčių pavyzdžiai apima, bet neapsiriboja sekančiais: anglies-anglies ryšiai (t.y., alifatinėse grandinėse), eteriai, amidai, uretanai ir pan. Apskritai, hidrolitiškai stabilios jungtys yra tokios, kurių hidrolizės dienos norma yra mažesnė nei apie 1-2% esant fiziologinėms sąlygoms. Tipiškų cheminių jungčių hidrolizės normos gali būti randamos daugumoje standartinių chemijos vadovėlių.

“PEG” arba polietileno glikolis, kaip naudojama šiame aprašyme, reiškia bet kokią vandenyje tirpų poli(alkilenoksidą). Dažniausiai, PEG naudojamas šiame išradime turi tokią struktūrą, “-CH₂CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂-”, kurioje viso PEG fragmento terminalinės grupės arba konkreči viso PEG fragmento architektūra gali būti skirtinga.

Paprasčiausias naudojamas PEG yra pakeistas gale PEG, kuriame vienas PEG galas yra užbaigtas palyginti neaktyvia grupe, paprastai alkoksi grupe, tokia kaip metoksi ($-\text{OCH}_3$), tuo tarpu kitas galas yra hidroksilo grupė, kuri gali būti chemiškai modifikuota. Tam tikros PEG formos, kurios naudojamos išradimo insulino konjugatų paruošimui, tokios kaip šakotosios, linijinės, dvišakės ir pan., bus detalios aprašytos toliau.

“PEG insulino konjugatas” nurodo insulino molekulę (kaip apibrėžta aukščiau), turinčią kovalentiškai prijungtą ar sujungtą mažiausiai vieną polietileno glikolio fragmentą ir turinčią bet kokią išmatuojamą insulino aktyvumo laipsnį (t.y. nuo apie 2% iki apie 100% ar daugiau natyvaus insulino biologinio aktyvumo.)

“Nominali vidutinė molekulinė masė” hidrofilinio, negamtinio polimero, tokio kaip PEG, kontekste, nurodo vidutinę polimero molekulinę masę, paprastai nustatomą molekulinį sietų chromatografiją, šviesos sklaidą arba ribiniu klampos skaičiumi 1,2,4-trichlorbenzene. Išradimo polimerai paprastai yra polidispersiški, turintys žemą, mažesnę nei 1,05 polidispersiškumo reikšmę.

“Lipofilinis fragmentas” yra toks, kuris prijungus jį prie išradime aprašyto hidrofilinio polimero, tiek suskaidomu ar nesuskaidomu ryšiu, yra iš esmės efektyvus pakeisti hidrofilinę polimero ir, tokiu būdu, polimero-insulino konjugato, prigimtį. Tipiškos lipofilinės grupės, tokios kaip riebalų rūgštys, susideda iš apie 12-22 anglies atomų.

“Iš esmės neimunogeninis” išradimo insulino konjugatas turi sumažintą imunogeniškumą palyginus su natyviu insulinu. Imunogeniškumas gali būti įvertintas nustatant antikūnų titrus pelėse arba, pageidautina, triušiuose, įvedus nemodifikuotą insuliną, ir palyginimui PEG insulino konjugatą.

“Alkilas” nurodo angliavandenilio grandines, paprastai esančias nuo 1 iki 15 atomų ilgio. Angliavandenilio grandinės yra pageidautinai, bet nebūtinai prisotintos ir gali pasirinktinai turėti prijungtas papildomas funkcines grupes. Angliavandenilio grandinės gali būti šakoto arba tiesaus pavidalo. Pavyzdinės alkilo grupės apima etilą, propilą, 1-metilbutilą, 1-etilpropilą ir 3-metilpentilą. Viename pageidautiname išradimo įgyvendinime konjugatai, susidedantys iš alkilinto PEG, ir ypatingai iš linijinio alkilinto PEG, yra tie, kurie turi alkilo dalį, kuri nėra riebalų rūgštis ar kitas lipofilinis fragmentas.

“Žemesnysis alkilas” reiškia alkilo grupę, susidedančią iš nuo 1 iki 5 anglies atomų ir esančia tiesios arba šakotos grandinės, kaip pavyzdžiui metilas, etilas, n-butilas, i-butilas, t-butilas.

“Absoliutus bioprieinamumas plaučiuose” yra įvestos į plaučius vaisto dozės (t.y., išradimo PEG insulino konjugato) procentas, absorbuojamo ir patenkančio į žinduolio kraują apytaką, atitinkantis intraveninio natyvaus insulino dozę. Tipiškos pavyzdinės sistemos absoliučiam bioprieinamumui plaučiuose įvertinti yra žiurkė, šuo, triušis ir beždžionė. Išradimo inhaliuojamos PEG insulino kompozicijos vienu aspektu yra apibūdinamos absoliučiu bioprieinamumu plaučiuose mažiausiai 20% plazmoje arba kraujyje, su absoliučiu bioprieinamumu plaučiuose nuo 10% iki 30% ar daugiau. Apskritai, priklausomai nuo specifinės PEG insulino konjugato prigimties, išradimo konjugatas turi absoliutų bioprieinamumą plaučiuose mažiausiai apie: 10%, 12%, 15%, 18%, 20%, 25%, 30%, 32%, 35% ar daugiau. Absoliutus bioprieinamumas plaučiuose gali būti paskaičiuotas išmatavus PEG insulino konjugato absorbciją, įvedus tiesioginiu intratrachėjiniu įvedimu, instaliacija arba inhaliacijos būdu.

“Pasiskirstymo fazė”, kalbant apie PEG insulino konjugato gyvavimo puslaikį, nurodo pradinę staigią fazę, kurios metu insulinas dingsta iš plazmos. Paskutinis lėtos arba eliminacijos fazės puslaikis reiškia lėtąją fazę, kurios metu insulinas yra pašalinamas iš kūno.

“Ilgalaikio poveikio” insulinas nurodo insuliną, kurio poveikio trukmė (t.y., didesnis nei bazinis kiekis kraujyje) yra mažiausiai 6 valandos, pageidautina mažiausiai 8 valandos.

“Sureguliuotas gliukozės kiekis” nurodo gliukozės lygį kraujyje (pvz., po išradimo PEG insulino konjugato įvedimo), kuris yra sureguliuotas žemiau foninio arba bazinio lygio.

“Farmaciniu požiūriu priimtina druska” apima, bet neapsiriboja, aminorūgščių druskas, druskas su neorganinėmis rūgštimis, tokiomis kaip chlorido, sulfato, fosfato, difosfato, hidrobromido ir nitrato druskos, arba druskas su organinėmis rūgštimis, tokias kaip malato, maleato, fumarato, tartrato, sukcinato, etilsukcinato, citrato, acetato, pieno, metansulfonato, benzoato, askorbato, para-toluensulfonato, palmoato, salicilato ir stearato, taip pat estolato, gluceptato ir laktiobionato druskos. Panašiai, druskos, turinčios farmaciniu požiūriu priimtina katijoną, apima, bet neapsiriboja, natrio, kalio kalcio, magnio, aliuminio, ličio ir amonio (įskaitant pakeisto amonio) druskas.

“Aminorūgštis” reiškia bet koki junginį, turintį ir amino, ir karboksirūgšties grupę. Nors amino grupės dažniausiai pasitaiko gretimoje karboksifunkcijai pozicijoje, amino grupė gali būti bet kurioje molekulės vietoje. Aminorūgštis taip pat gali apimti papildomas funkcinės grupes, tokias kaip amino, tio, karboksilo, karboksamido, imidazolo ir kt. Aminorūgštis gali būti sintetinė arba gamtinė, bei gali būti panaudojama tiek raceminėje tiek optiškai aktyvioje (D-, arba L-) formoje, įskaitant įvairias enantiomerų proporcijas.

“Peptidai” yra sudaryti iš dviejų ar daugiau aminorūgščių, sujungtų peptidiniu ryšiu. Peptidai gali būti homo- arba hetero- peptidai (t.y., sudaryti iš identiškų arba skirtingų aminorūgščių liekanų kaip aprašyta aukščiau), bei gali būti nuo dviejų aminorūgščių iki keleto šimtų aminorūgščių ilgio.

“Sausi milteliai” nurodo miltelius, kurie paprastai turi mažiau kaip 10% drėgmės.

Kompozicija, kuri yra “tinkama įvedimui į plaučius” nurodo kompozicija, kuri gali būti aerosolizuota ir inhaliuota taip, kad dalis aerosolizuotų dalelių pasiekia plaučius bei leidžia prasiskverbti į kvėpavimo traktą bei alveoles. Tokia kompozicija yra laikoma įkvepiama arba inhaliuojama.

“Aerosolizuotos” dalelės yra skystos arba kietos dalelės, kurios yra suspenduotos dujose, paprastai kaip inhaliacinio prietaiso paleidimo (arba suveikimo) rezultatas, tokio kaip sausų miltelių inhaliatoriaus, pulverizatoriaus, kalibruotos dozės inhaliatoriaus arba purškiklio.

“Emituota dozė” arba “ED” numato vaisto formos pateikimo indikacijas po paleidimo arba dispergavimo atitinkamame inhaliaciniame įtaise. Dar konkrečiau, sausų miltelių vaisto formoms, ED yra procentinis miltelių kiekis, kuris yra ištrauktas iš vienietinės dozės pakuotės ir kuris yra inhaliacinio prietaiso kandiklyje. ED yra apibrėžiamas kaip inhaliaciniame prietaise pateiktos ir nominalios dozės santykis (t.y., miltelių vienietinės dozės masė, patalpinta atitinkamame inhaliaciniame įtaise prieš paleidimą). ED yra eksperimentiškai apibrėžiamas parametras ir paprastai jis yra apibrėžiamas naudojant *in-vitro* įtaisą, kuris nustatytas imituoti ligonio dozavimą. ED reikšmės nustatymui nominali sausų miltelių dozė, paprastai vienietinės dozės formoje, yra patalpinama atitinkamame sausų miltelių inhaliaciniame prietaise (tokiame kaip aprašyta JAV patente NR. 5785049, Inhale Therapeutics Systems), kuris įjungtas disperguoja miltelius. Susidaręs aerosolio debesis yra vakumu ištraukiamas iš įtaiso, kur jis yra užfiksuojamas filtre, kuris yra prijungtas prie prietaiso kandiklio. Miltelių kiekis, kuris

pasiekia filtrą ir sudaro emituotą dozę. Pavyzdžiui, jei 5 mg sausų miltelių turinti dozės forma patalpinta inhaliaciniame įtaise, ir jei miltelių dispergavimo metu gauna 4 mg miltelių ant filtro kaip aprašyta aukščiau, tuomet emituota sausų miltelių kompozicijos dozė yra: $4 \text{ mg (gauta dozė)} / 5 \text{ mg (nominali dozė)} \times 100 = 80 \%$. Nehomogeniniams milteliams ED vertė parodo ne sausų miltelių, o vaisto pristatymą iš inhaliacinio įtaiso po paleidimo ir yra paremta vaisto kiekiu, o ne sausų miltelių mase. Panašiai MDI ir purškiamoms dozavimo formoms ED atitinka vaisto procentinę dalį, kuri yra ištraukiama iš dozavimo formos ir kuri yra inhaliacinio prietaiso kandiklyje.

“Smulkių dalelių dozė” arba “FPD” yra apibrėžiama kaip miltelių dalelių masės procentas, kurios turi aerodinaminį skersmenį mažesnę nei $3.3 \mu\text{m}$, paprastai išmatuotą Anderseno pakopiniu prietaisu. Šis parametras parodo koks procentas dalelių turi didžiausią galimybę pasiekti ligonio giliuosius plaučius, kur vaistinė medžiaga būtų sistemiškai sunaudota.

“Dispersiniai” arba “išsklaidyti” milteliai yra tokie, kurių ED vertė yra mažiausiai 30%, labiau pageidautina 40-50%, ir dar labiau pageidautina mažiausiai 50-60% ar didesnė.

“Masės vidurinis skersmuo” arba “MMS” yra vidutinio dalelės dydžio matas, kadangi išradimo milteliai paprastai yra polidispersiški (t.y., susideda iš įvairaus dydžio dalelių). MMS reikšmės, duodamos šiame aprašyme, yra nustatytos sedimentacijos centrifuguojant būdu, nors ir daugelis kitų paprastai vartojamų būdų gali būti panaudoti vidutinio dalelės dydžio išmatavimui (t.y. elektroninė mikroskopija, šviesos sklaida, lazerinė difrakcija).

“Masės vidurinis aerodinaminis skersmuo” arba “MMAS” yra disperguotos dalelės aerodinaminio dydžio matas. Aerodinaminis skersmuo yra naudojamas aerolizuotų miltelių nusėdimui aprašyti, ir yra skersmuo vienodo tankio sferos, turinčios tą patį nusėdimo greitį ore, kaip ir dalelė. Aerodinaminis skersmuo apima dalelės formą, tankumą ir fizinį dydį. Šiame aprašyme naudojama MMAS reikšmė nurodo aerodinaminį dalelės dydžio aerolintuose milteliuose pasiskirstymo, nustatyto kaskadiniu spaudimu, vidurinį tašką arba medianą, jei nenurodyta kitaip.

“Farmaciniu požiūriu priimtinas užpildas arba nešiklis” nurodo užpildą, kuris gali pasirinktinai būti įtrauktas į išradimo kompozicijas. Inhaliacinėms kompozicijoms

pageidautini užpildai, kurie gali būti įtraukti į plaučius be jokio žyminio neigiamo toksinio poveikio subjektui ir ypač subjekto plaučiams.

“Farmaciniu požiūriu efektyvus kiekis” arba “fiziologiškai efektyvus kiekis” yra PEG insulino konjugato, esančio terapinėje formoje, kuri aprašyta šiame aprašyme, kiekis, kurio reikia, norint palaikyti pageidaujamą insulino lygį kraujotakos sistemoje bei pasiekti reikalingą gliukozės lygį. Tikslus kiekis priklausys nuo daugelio veiksnių, t.y. nuo konkretaus PEG insulino, naudojamo įvedimo įtaiso, terapinės kompozicijos komponentų ir jų fizinių charakteristikų, planuojamos ligonių populiacijos, ligonio aplinkybių ir pan., bei gali būti lengvai nustatoma tos srities specialisto, remiantis čia pateikiama informacija.

II. Hidrofiliniai, negamtiniai polimero – insulino konjugatai

Remiantis išradimu, buvo paruošta keletas iliustracinių PEG insulino konjugatų. Nors polietilenglikolis yra pageidautinas polimeras ruošiant išradimo konjugatus, taip pat gali būti panaudoti kiti vandenyje tirpūs, hidrofiliniai, negamtiniai polimerai. Kiti polimerai, tinkami naudojimui išradime, apima polivinilpirolidoną, polivinilalkoholį, poliakriloilmorfiliną, polioksazoliną, bei poli(oksietilintus poliolius), tokius kaip poli(oksietilintą glicerolį), poli(oksietilintą sorbitolį) ir poli(oksietilintą gliukozę). Taip pat gali būti naudojami polimerai, susidedantys iš subvienetų arba subvienetų blokų, atrinktų iš aukščiau paminėtų vandenyje tirpių polimerų. Be to, gali būti vartojami ir polietilenglikolio ir polipropilenglikolio ko-polimerai. Pageidautina, kad išradimo polimerai iš esmės nebūtų riebalų rūgštys ar kiti lipofiliniai fragmentai.

Sekantis skyrius parodo, kad atidžiai parinkus vieną ar daugiau PEG fragmentų, pegilinimo reagentus, insulino pegilinimo vietas, pegilinimo sąlygas ir po to einantį konjugato gryninimą, gali būti gaunamos PEG-insulino kompozicijos, turinčios reikiamas klinikines savybes (t.y., pagerintas farmakokinetines ir/arba farmakodinamines savybes). Specifinės išradimo PEG insulino konjugatų savybės pateikiamos toliau.

A. Struktūrinės polimero ir susidariusio konjugato savybės

Išradimo PEG insulino konjugatas paprastai susideda iš vienos arba daugiau PEG grandinių, kurių kiekvienos molekulinė masė svyruoja nuo 200 iki apytiksliai 40000

daltonų, o pageidautinai svyruoja nuo 200 iki 10000 daltonų. Pageidautina, išradime naudojamas PEG turės vidutinę molekulinę masę svyruojančią išvardintose ribose: nuo 200 iki 100000 daltonų, nuo 200 iki 75000 daltonų, nuo 2000 iki 6000 daltonų, nuo 200 iki 5000 daltonų, nuo 200 iki 3000 daltonų, nuo 2000 iki 2000 daltonų ir nuo 200 iki 1000 daltonų. Pavyzdiniai su PEG paruošti konjugatai, turintys 5000, 2000 ir 750 daltonų molekulinę masę yra pateikti 1-4-ame pavyzdžiuose.

Pageidautini PEG-insulinai, skirti įvedimui į plaučius, apima PEG fragmentą, turintį mažesnę nei 5000 daltonų molekulinę masę, pageidautina mažesnę nei 2000 daltonų arba netgi mažiau nei 1000 daltonų. Viename ypatingame išradimo įgyvendinime PEG insulino konjugatas apima PEG jungtį, turinčią vieną iš sekančių vidutinių molekulinų masių: 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 arba 5000. Didesnės molekulinės PEG masės gali būti atskirais atvejais mažiau pageidautinos dėl potencialaus insulino molekulės aktyvumo praradimo arba, įvedus į plaučius, dėl sumažėjusio efektyvumo pereinant plaučius (8 pavyzdys).

Tuo tarpu kai žemesnės molekulinės masės PEG gali būti pageidaujamos dėl didėjančio bioprieinamumo, didesnės molekulinės masės PEG grandinės, t.y. turinčios vidutinę molekulinę masę lygią 5000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 40000 ar daugiau daltonų, nors ir aptikta, kad apskritai mažina natyvaus insulino bioprieinamumą, tačiau gali būti pageidautinos dėl didesnio puslaikio, ypač injekuojamų vaisto formų atveju. Tai reiškia, kad žymus farmakokinetinių parametrų pagerinimas, t.y., plotas po kreive (AUC), didelės molekulinės masės PEG insulinui (palyginti su natyviu) gali daugiau nei kompensuoti prarastą aktyvumą.

Kalbant apie subvienetų skaičių, išradime naudojami PEG paprastai susidės iš (OCH_2CH_2) subvienetų, kurių skaičius svyruos šiose ribose: nuo 2 iki 900, nuo 4 iki 200, nuo 10 iki 100, nuo 4 iki 70, nuo 4 iki 45 ir nuo 4 iki 25 subvienetų.

PEG insulino išradimo konjugatas gali būti mono-pakeistas (t.y., turintis PEG, prijungtą prie vienintelės reaktyvios insulino vietos), di-pakeistas (turintis PEG fragmentus, prijungtus prie dviejų reaktyvių vietų), tri-pakeistas ar netgi turintis daugiau nei 3 insulino molekulės vietose prijungtus polimerus. Mono-pakeistas, di-pakeistas ir tri-pakeistas insulinas taip pat šiame aprašyme nurodo PEG monomerą, dimerą ir trimerą atitinkamai. Multi-pakeistas insulinas (t.y. insulinas turintis kovalentiškai prijungtus PEG fragmentus daugiau nei 2-ose insulino vietose) paprastai, tačiau nebūtinai apima tą patį

PEG fragmentą, prijungtą prie aktyvios vietos. Tai reiškia, kad PEG insulino kompozicijos turinčios daugiau nei vienos rūšies prijungtą prie insulino PEG tiltelį yra svarstytinios. Pageidautinos kompozicijos pagal išradimą yra tos, kurios daugiausia apima monomerinius ir/arba dimerinius insulino konjugatus. Stebėtina, PEG insulino kompozicijos, kurios nėra specifinės vietos atžvilgiu (apimančios PEG insulino rūšių mišinį, turintį PEG kovalentiškai prijungtą prie daugiau nei vienos reaktyvios vietos) buvo atrastos kaip turinčios geresnes nei natyvaus insulino farmakokinetines ir farmakodinamines savybes, ypačiai įvedus į plaučius (pavyzdys 11).

Dėl PEG pakaito vietos, tai insulino molekulės turi keletą vietų, tinkančių pegilinimui, iš kurių paprastai, bet nebūtinai, labiausiai pageidautinos yra amino grupės. Specifinės insulino amino grupės, tinkamos pegilinimui, apima dvi N-terminalines grupes, GlyA1 ir PheB1, taip pat LysB29. Šios insulino molekulės vietos šiame aprašyme taip pat yra vadinamos tiesiog A1, B1 ir B29 atitinkamai. Elektrofiliškai aktyvuoti PEG, naudojami prijungimui prie reaktyvių insulino amino grupių apima mPEG2-ALD, mPEG-sukcinimidilpropionatą, mPEG-sukcinimidilbutanoatą, mPEG-CM-HBA-NHA, mPEG-benzotriazolkarbonatą, mPEG-acetaldehido dietilo acetatį ir pan. (Shearwear Corporation, Huntsville, Alabama).

Viename įgyvendinime išradimo kompozicija gali turėti daugiausia (daugiau nei 90%) monopakeisto insulino, t.y., mono-A1 insulino, mono-B1 insulino arba mono-B29 insulino. Tokia kompozicija gali turėti: i) mono-A1 insuliną, ii) mono-A1 ir mono-B1 insulino mišinį arba iii) mono-A1, mono-B1 ir mono-B29 insulino mišinį. Alternatyviu atveju, išradimo kompozicija gali turėti daugiausiai di-pakeisto insulino, t.y., di-A1,B1 – insuliną arba di-A1, B29 insuliną, arba di-B1,B29 insuliną bei bet kokią išvardintų kombinaciją.

Kitu atveju besiremianti išradimu kompozicija gali turėti įvairių PEG-insulino konjugatų mišinį (t.y., PEG prijungtus prie bet kokios galimos prijungimų kombinacijos). Naudojant amino grupę insuline kaip pavyzdį, išradimo kompozicija gali turėti bet kurį ar daugiau iš sekančių PEG insulino konjugatų: monoA1-PEG insuliną, mono-B1-insuliną, mono-B-29 insuliną, di-A1,B1-insuliną, di-A1,B29 insuliną, di-B1,B29 insuliną arba tri-A1,B1,B29 insuliną. Viename įgyvendinime pageidautinos tos kompozicijos, kurios daugiausia susideda iš monomerų ir dimerų. Būdingos kompozicijos gali apimti PEG insulino konjugatų mišinius, turinčius mažiausiai 75% mišrių monomerų ir dimerų.

mažiausiai 80% mišrių monomerų ir dimerų arba mažiausiai 90% mišrių monomerų ir dimerų (pvz., 5 ir 6 pavyzdžiai).

PheB1 yra ypatingai pageidautina vieta cheminėms modifikacijoms atlikti, prijungiant PEG. Ypatingai, PEG insulino konjugato kompozicija skirta naudoti išradime viename įgyvendinime gali būti apibūdinta kaip kompozicija, kurioje mažiausiai 70% B-1 insulino vietų yra kovalentiškai prijungtos prie PEG, nepaisant visuminio PEG insulino rūšių kompozicijoje skaičiaus (pvz., lentelė 3A, pavyzdys 5). Alternatyvūs įgyvendinimai apima tuos, kuriuose mažiausiai 75% B-1 vietų insuline yra kovalentiškai prijungtos prie PEG, arba kuriuose mažiausiai 80% B-1 vietų insuline yra kovalentiškai prijungtos prie PEG, arba kuriuose mažiausiai 90% B-1 vietų insuline yra kovalentiškai prijungtos prie PEG.

Netikėtai išradėjai atrado, kad atsitiktiniai PEG insulino mišiniai (paruošti atsitiktiniu, o ne nukreiptu į tam tikrą vietą pegiliniu) įvedus į plaučius sąlygoja aukštesnį insulino lygį kraujyje, kuris yra po įvedimo išlaikomas mažiausiai 6 valandas, o paprastai mažiausiai 9 valandas arba daugiau. Tokie mišiniai yra naudingi ne tik dėl jų palankių farmakokinetinių ir farmakodinaminių savybių, bet ir dėl jų daug paprastesnės (nereikia atlikti daug sintezės etapų, nereikalauja apsauginių grupių naudojimo, nereikia daugiastadijinio gryninimo ir kt.) sintezės nei taikant vietą parenkantį metodą.

Alternatyvios natyvaus insulino molekulės vietos, kurios gali būti chemiškai modifikuotos kovalentišku PEG prijungimu apima 2 C-galą, Arg22B, His10B, His5A, Glu4A, Glu17A, Glu13B ir Glu21B.

Be natyvaus insulino, negamtiniai insulintai turintys vieną ar daugiau aminorūgšties pakeitimų, įterpimų ar ištrynimų gali būti panaudojami taip, kad papildomos vietos būtų tinkamos cheminėms modifikacijoms prijungiant vieną ar daugiau PEG tiltelių. Šis išradimo įgyvendinimas yra ypatingai naudingas įvedant papildomas, pritaikytas pegilavimo vietas insulino molekulėje, pavyzdžiui dėl PEG-insulino, turinčio didesnę atsparumą fermentiniam skaidymui, suformavimo. Šis traktavimas pateikia didesnę optimizuoto insulino konjugato, turinčio pageidaujamą aktyvumą, stabilumą, tirpumą ir farmakologinių savybių balansą, modelio lankstumą. Nors ir mutacijos gali būti atliktos, t.y., specifine vietos atžvilgiu mutageneze, daugelyje insulino molekulės vietų, tačiau pageidautini insulino variantai, kuriuose bet kuris iš pirmų keturių amino rūgščių B grandinėje yra pakeista cisteino liekana. Tokios cisteino liekanos gali reaguoti su

aktyvuotais PEG, kas yra būdinga reakcijoms su tiolio grupėmis, pvz., N-maleimidilpolimerais ar kitais dariniais, kaip aprašyta patente US 5739208 ir tarptautinėje patentinėje publikacijoje WO 01/62827. Pavyzdiniai sulfhidrilui selektyvūs PEG, naudojami ypatingame išradimo įgyvendinime, apima mPEG-dvišakį maleimidą ($mPEG(MAL)_2$), mPEG2-dvišakį maleimidą ($mPEG2-(MAL)_2$), mPEG maleimidą ($mPEG-MAL$) ir mPEG2-maleimidą ($mPEG2-MAL$) (Shearwater Corporation). Šių aktyvuotų PEG struktūros yra sekančios: mPEG- $CONHCH[CH_2CONH(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2-MAL$, mPEG2-lizinas-NH- $CH[CH_2CONH(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2-MAL]_2$, mPEG-MAL, ir mPEG2-lizinas-NH- $CH_2CH_2NHC(O)CH_2CH_2MAL$, atitinkamai.

Papildomos natyvaus insulino sekų mutacijos gali būti naudojamos, jei reikia padidinti PEG insulino konjugato, kurio biologinis aktyvumas po pegilinimo yra šiek tiek kompromisinis, bioaktyvumą. Viena iš tokių mutacijų yra Thr8 į His8. Papildomos mutacijos gali būti rastos, pavyzdžiui *Diabetes Care*, 13(9), (1990), kurio turinys čia cituojamas.

PEGiai šio išradimo reikmėms gali turėti įvairią struktūrą: linijinę, dvišakę, šakotą, hantelių formos ir pan. Paprastai PEG yra aktyvuotas tinkama aktyvuojančia grupe, atitinkančia norimą (as) prijungimo vietą (as) insulino molekulėje. Aktyvuotas reakcijai su insulinu PEG turi reaktyvią grupę molekulės gale. Čia vartojamas terminas "tiltelis" savo reikšme apima aktyvuojančią grupę, esančią PEG gale, skirtą reakcijai su insulinu, ir gali dar apimti papildomus atomus (paprastai inertiškus), esančius tarp PEG polimerinės dalies ir gale esančios aktyvuotos grupės, kad palengvintų aktyvuoto PEG gavimą. Tiltelis gali turėti bet kokį skaičių atomų, tačiau pageidautini yra tilteliai, turintys metileno grupes, atskiriančias šoninę PEG grandinę ir galinę aktyvuotą grupę, kaip, pvz., yra mPEG-sukcinimidilpropionate ir mPEG-butanoate. Tipiški aktyvuoti PEG dariniai ir šių agentų konjugavimo su vaistu, tokiu kaip insulinas, būdai yra gerai žinomi ir aprašyti Zalipsky, S., *et al.*, "Use of Functionalized Poly(Rethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" knygoje *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J.M.Harris, Plenum Press, New York (1992), ir *Advanced Drug Reviews*, 16:157-182 (1995).

Viename konkrečiame išradimo įgyvendinime konjugato PEG dalis neturi vienos ar daugiau lipofilinių grupių, galinčių žymiai pakeisti tirpaus vandenyje polimero arba

polimero-insulino konjugato prigimtį. Kitaip tariant, išradimo konjugato neinsulininė dalis arba polimeras gali turėti grupę atomų, laikytiną labiau lipofiliniais, negu hidrofiliniais (pvz., anglies grandinė, turinti nuo maždaug 2 iki maždaug 8-12 anglies atomų), tačiau, jei tokios grupės ar grupių buvimas žymiai nepakeičia polimero ar konjugato hidrofilinės prigimtys, toks fragmentas gali būti išradimo konjugato sudėtyje. Kitaip tariant, išradimo insulino konjugatas pats savaime charakterizuojamas kaip hidrofilinis, o ne lipofilinis ar amfifilinis. Paprastai insulino konjugato polimero dalis, prieš prijungiant prie insulino, ar turi ar ne tokią lipofilinę grupę, pasižymi hidrofilinės/lipofilinės pusiausvyros (HLB) skaičiumi. HLB skaičius remiasi kiekvieno tipo grupių (hidrofilinių ar lipofilinių) molekulėje masės procentine sudėtimi; paprastai reikšmė svyruoja nuo maždaug 1 iki 40. Polimeras, skirtas naudoti išradimo konjugatuose charakterizuojami kaip hidrofiliniai, nepaisant vieno ar daugiau lipofilinių pakaitų buvimo. Viename išradimo įgyvendinime polimero-insulino konjugato polimerinė dalis charakterizuojama HLB skaičiumi, didesniu nei 25 ir, geriau, didesniu nei 30, ir netgi dar geriau, didesniu nei 35. Tam tikruose išradimo įgyvendinimuose, kur toks lipofilinis fragmentas gali būti, pageidautina, kad jis nebūtų PEG grandinės gale.

Šakoti PEG, skirti naudoti išradimo konjugatuose, apima parašytus Tarptautinėje patente p[ublikacijoje WO 96/21469, kuri čia visa apimtimi cituojama. Paprastai šakoti PEG gali būti vaizduojami formule $R(PEG-OH)_n$, kur R reiškia cetrinę šerdies molekulę, o n reiškia šakų skaičių. Šakotos konfigūracijos atveju šakota polimero šerdis turi vienintelį reaktyvų centrą insulino prijungimui. Tipiniu atveju šakoti PEG, skirti šiam išradimui, turi mažiau nei 4 PEG šakas, geriau, turi mažiau nei 3 šakas. Šakoti PEG turi tą privalumą, kad vienintelis reaktyvus centras yra apsuptas didesniu, tankesniu polimero debesėliu, lyginant su linijiniu PEG. Vienas konkretus šakoto PEG tipas gali būti pavaizduotas kaip $(MeO-PEG)_pR-X$, kur p yra lygus 2 arba 3, R yra centrinė struktūra, tokia kaip lizinas ar glicerolis, turintis prie jų prijungtas 2 arba 3 PEG šakas, o X reiškia bet kurią tinkamą funkcinę grupę, kuri yra arba gali būti aktyvuota insulino prijungimui. Vienas ypač pageidautinas šakotas PEG yra mPEG2-NHS (Shearwater Corporation, Alabama), turintis struktūrą mPEG2-lizin-sukcinimidas.

Dar kitoje šakotoje struktūroje, "kabantis PEG" turi reaktyvias grupes baltymo prijungimui, išdėstytas išilgai pagrindinės PEG grandinės, o ne PEG grandinių gale, kaip ankstesniame pavyzdyje. Reaktyvios grupės insulino prijungimui, esančios pagrindinėje

PEG grandinėje, gali būti vienodos ar skirtingos. Kabančios PEG struktūros gali būti naudingos, bet paprastai yra mažiau pageidautinos, ypač kompozicijų inhaliavimui atveju.

Alternatyviai, PEG-insulino PEG dalis gali turėti dvišakę struktūrą, turinčią šakotą fragmentą viename polimerinės grandinės gale ir dvi laisvas reaktyvias grupes (ar bet kurį 2 kartotinį skaičių), prie šakoto fragmento insulino prijungimui. Pavyzdiniai dvišakiai PEG aprašyti Tarptautinėje patento publikacijoje WO 99/45964, kurio turinys čia cituojamas. Dvišakis polietileno glikolis gali pasirinktinai turėti alkilo arba R grupę priešingame polimero grandinės gale. Konkrečiau, pagal šį išradimą dvišakis PEG-insulino konjugatas turi formulę $R\text{-PEG-L(Y-insulinas)}_n$, kur R yra alkilas, L yra hidrolitiškai stabili šakos vieta ir Y yra rišančioji grupė, kuri užtikrina dvišakio polimero cheminį ryšį su insulinu, n yra 2 kartotinis.

L gali reikšti vieną šerdies grupę, tokią kaip -CH- , arba gali apimti ilgesnę atomų grandinę. Pavyzdinės L grupės apima liziną, glicerolį, pentaeritrolį arba sorbitolį. Paprastai centrinis šakos atomas išsišakojusiame fragmente yra anglis.

Konkrečiame išradimo įgyvendinime dvišakio PEG rišanti su insulinu grupė, (Y), yra hidrolitiškai stabili. Geresniame įgyvendinime n yra 2. Tinkami Y fragmentai prieš prijungiant prie reaktyvios insulino vietos apima, bet neapsiriboja aktyvius esterius, aktyvius karbonatus, aldehydus, izocianatus, izotiocianatus, epoksidus, alkoholius, maleimidus, vinilsulfonus, hidrazidus, ditiopiridinus ir jodacetamidus. Tinkamos aktyvuotos grupės parinkimas priklauso nuo norimos prijungimo vietos insulino molekulėje, tą lengvai padarys šios srities specialistas. Susidariusiame PEG-insulino konjugate atitinkanti Y grupė yra ta, kuri atsiranda aktyvuoto dvišakio polimero reakcijos su tinkama reaktyvia insulino grupe pasekoje. Šios srities specialistas lengvai nustatys tokią galutinę surišančią grupę. Pavyzdžiui, jei reaktyvus dvišakis PEG turi aktyvuotą esterį, tokį kaip sukciminido ar maleimido esterį, konjugavimas su insulino amino grupe leis susidaryti atitinkami rišančiajai amido grupei. Šie konkretūs dvišakiai polimerai yra ypač patrauklūs, nes jie duoda konjugatus, turinčius insulino molinį santykį su PEG 2:1 ar didesnį. Tikėtina, kad tokie konjugatai mažiau blokuos insulino receptorių, tuo pat metu užtikrindami galimybę apsaugoti insuliną nuo fermentinio suskaidymo, pvz., insuliną skaidančiu fermentu.

Susijusiame įgyvendinime dvišakis PEG-insulino konjugatas vaizduojamas formule $R\text{-[PEG-L(Y-insulinas)}_2]_n$. Šiuo atveju R reiškia centrinę šerdies struktūrą, turinčią prie

jos prijungtą bent vieną PEG-di-insulino konjugatą. Konkrečiai, pagal šį išradimo aspektą pageidautini dvišakiai polimerai yra tokie, kur n yra parinktas iš grupės, susidedančios iš 1, 2, 3, 4, 5 ir 6. Pavyzdinės šerdies R struktūros gali būti lizino, glicerolio, pentaeritrioio arba sorbitolio pagrindu.

Alternatyviame įgyvendinime bet kurioje čia pateikiamoje pavyzdinėje struktūroje cheminis ryšys tarp insulino ir polimero šakos vietos gali būti suskaidomas (t.y., hidrolitiškai nestabilus). Alternatyviai, polimero šoninėje grandinėje gali būti viena ar daugiau suskaidomų ryšių, kad leistų generuoti *in vivo* PEG-insulino konjugatą su mažesne PEG grandine, nei pradžioje įvesto konjugato. Tokie pasirenkami polimero konjugato požymiai suteikia galimybę papildomai įvedimo metu valdyti galutinai norimas farmakologines konjugato savybes. Pavyzdžiui, gali būti įvedamas didelis ir santykinai inertiškas konjugatas (t.y., turintis vieną ar daugiau didelės molekulinės masės PEG grandines, pvz., vieną ar daugiau PEG grandinių, turinčių molekulinę masę didesnę nei maždaug 10000, kur konjugatas iš esmės nepasižymi bioktyvumu), kuris vėliau arba plaučiuose arba kraujotakoje hidrolizuodamas ir duoda bioaktyvų konjugatą, turintį dalį pradinės PEG grandinės. Tokiu būdu, PEG-insulino konjugato savybės gali būti efektyviau pritaikomos. Pavyzdžiui, pradinio polimero konjugato absorbcija gali būti lėta pradinio įvedimo metu, kuris geriausia, bet nebūtinai, yra inhaliacija. *In vivo* suskaidžius hidrolitiškai suskaidomą ryšį, atpalaiduojamas arba insulinas, arba insulinas su prie jo prijungtu mažu polietileno fragmentu, ir jis lengviau absorbuojamas per plaučius ir/arba įtraukiamas į cirkuliaciją kraujyje.

Pagal vieną šio įgyvendinimo požymį nepaveiktas polimero-insulino konjugatas prieš hidrolizę minimaliai suskaidomas įvedimo metu, taip, kad suskaidomo ryšio hidrolizė yra efektyvi užtikrinti lėtą aktyvaus insulino atpalaidavimo į kraujotaką greitį, o ne insulino fermentinį suskaidymą prieš atpalaiduojant jį į kraujo apytaką.

Tinkami fiziologiškai suskaidomi ryšiai apima esterį, karbonato esterį, karbamatą, sulfatą, fosfatą, aciloksialkileterį, acetalį ir ketalį, bet jais neapsiriboja. Tokie konjugatai turėtų turėti fiziologiškai suskaidomą ryšį, kuris būtų stabilus saugant ir įvedant. Pavyzdžiui, konjugatas PEG-suskaidomas ryšys-insulinas turėtų išlaikyti savo vientisumą gaminant galutines farmacines kompozicijas, tirpinant tinkamame pristatymo nešiklyje, jei toks vartojamas, ir įvedant, nesvarbu koku būdu.

Konkrečiau, kaip bendru atveju aprašyta aukščiau, biosuskaidomus ryšius turintys ir naudingi šiame išradime PEG-insulino konjugatai turi tokias struktūras: PEG1-W-PEG2-insulinas (kur PEG1 ir PEG2 gali būti vienodi arba skirtingi) arba PEG-W-insulinas, kur W reiškia silpną biologiškai suskaidomą ryšį. Šie konjugatai turi PEG šakas arba PEG šakų dalis, kurios yra pašalinamos (t.y., atskeliamos) *in vivo*. Šie konkretūs modifikuoti insulinai paprastai yra iš esmės biologiškai neaktyvūs, kol jie yra nepaveikti, arba dėl nepaveiktos PEG molekulės dalies dydžio, arba dėl insulino molekulės aktyvaus centro erdvinio blokavimo PEG grandine. Tačiau tokie konjugatai yra suskaidomi fiziologinėse sąlygose, kad tokiu būdu atpalaiduotų insuliną arba biologiškai aktyvų PEG-insuliną, gebantį absorbuotis į kraujotaką, pvz., per plaučius. Pirmojoje pavyzdinėje struktūroje PEG1 dalis gali turėti bet kokį skaičių skirtingų čia aptartų struktūrų ir paprastai turi molekulinę masę mažiausiai apie 10000, taigi konjugatas įvedus nėra greitai absorbuojamas. PEG2 molekulės dalis, geriausia, turi molekulinę masę mažiau nei maždaug 5000 daltonų, geriau, mažiau nei 2000 daltonų, ir netgi dar geriau mažiau nei 1000 daltonų. Kalbant apie antrąją pavyzdinę struktūrą PEG-W-insulinas, PEG dalis paprastai turi molekulinę masę mažiausiai 10000 daltonų ar daugiau.

Dar viename specifiniame išradimo įgyvendinime PEG-insulino konjugatas turi hantelių pavidalo struktūrą, kur dvi insulino molekulės yra tarpusavyje sujungtos centrine PEG molekule. Konkrečiau, tokie konjugatai gali būti vaizduojami struktūra insulinas- y-PEG-Z-insulinas, kur Y ir Z yra hidrolitiškai stabilaus ryšio grupės, surišančios insuliną su PEG fragmentu. Konkrečiame įgyvendinime, Z yra aktyvuotas sultonas, kuris prieš konjugavimą gali reaguoti su insulino tiolio grupe (pvz., cisteinu). Alternatyviai, Y ir Z gali būti bet kokia grupė, tinkanti kovalentiškai susirišti su insulinu. Papildomi pavyzdžiai yra pateikti patente US 5900461, kurio turinys čia cituojamas.

Papildomi pavyzdiniai mono- arba difunkcionalizuoti PEG, turintys arba linijinę, arba šakotą struktūrą, skirti šio išradimo konjugatų gamybai, gali būti įsigyti iš Shearwater Corporation (Alabama). Struktūrų pavyzdžiai aprašyti Shearwater 2001 kataloge "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications", kurio turinys čia cituojamas.

B. Gavimas

PEG prijungimo prie insulino reakcijos sąlygos skiriasi priklausomai nuo naudojamo konkretaus PEG darinio, insulino prijungimo vietos ir konkretaus reaktyvios grupės tipo (t.y., lizino ar cisteino), norimo pegilinimo laipsnio, ir pan., bei gali būti lengvai nustatytos šios srities specialisto.

Kaip detaliau parodyta toliau, šio išradimo konjugatų sintezė gali būti specifinė vietos atžvilgiu (1, 2 ir 4 pavyzdys) arba atsitiktinė (3 pavyzdys). Tinkamos PEG aktyvuotos grupės reakcijai su insulino amino grupėmis (pvz., GlyA1, PheB1, Lys29B), yra trezilato, aldehido, epoksido, karbonilimidazolo, aktyvių karbonatų (pvz., sukcinimidilkarbonato), acetalio ir aktyvių esterių, tokių kaip N-hidroksisukcinimido (NHS), grupės ir NHS-derivatizuoti PEG. Iš šių reaktingiausios yra PEG karboksimetil-NHS, norleicin-NHS, ir sukcinimidilkarbonatas. Papildomi PEG reagentai insulino prijungimui yra PEG sukcinimidilsukcinatas ir propionatas. Šiam išradimui tinkami PEG aktyvūs esteriai, pvz., turintys vieną propano ar butano rūgšties fragmentą, aprašyti patente US 5672662, kurio turinys čia įtraukiamas visumoje. Specifiniai aktyvūs esteriai išradimo konjugatų gamybai apima mPEG-sukcinimidilpropionatą ir mPGE-sukcinimidilbutanoatą (1-4 pavyzdžiai).

Šios srities specialistas įprastiniais eksperimentais lengvai nustatys optimalias eksperimento sąlygas specifiniam konjugatui.

Reaktyvios grupės, tinkamos PEG-polimero aktyvavimui, kad prijungtų prie insulino tiolio (sulfhidrilo) grupių, apima vinilsulfonus, jodacetamidą, maleimidą ir ditio-orto-piridiną. Ypač teikiama pirmenybė reagentams, apimantiems PEG vinilsulfonus ir PEG-maleimidą. Papildomi pavyzdiniai vinilsulfonai, skirti naudoti šiame išradime, aprašyti patente US 5739208, kurio turinys čia specialiai cituojamas.

Kai kuriais atvejais išradimo kompozicijos apima selektyviai PEGilintą insuliną, t.y., susidarę konjugatai yra iš esmės homogeniški pegilinimo vietos ir laipsnio atžvilgiu. Kitaip tariant, amino grupės pegilinimas, selektyvus vietos atžvilgiu arba nukreiptas į tam tikrą vietą, duoda insulino konjugato kompoziciją, kurioje labiausiai norimos prijungti vietos, pvz., PheB1, turi prie jų prijungtą PEG fragmentą. Priklausomai nuo norimos pegilinimo vietos, gali reikėti naudoti blokavimo/deblokavimo sintezės strategiją, kad pegilinimas išvengtų nepageidaujamų reaktyvių vietų insulino molekulėje, pvz., naudojant apsaugines grupes, tokias kaip t-BOC (tret-butoksikarbonilo) arba di-BOC (di-butoksikarbonilo).

Kitos tinkamos amino grupę apsaugančios grupės apima karbобензокси (CBZ), tritilo darinius, tokius kaip tritilas (Tr), dimetoksitritilas (DMTr) ir pan. Kitos apsauginės grupės, tokios kaip ciklinės diacilo grupės arba nitrofenilsulfenilo (Nps) grupė, taip pat gali pasiteisinti naudojant amino funkcijos apsaugai. Pavyzdinė 5K-PEG-insulino kompozicijos sintezė, nukreipta į tam tikrą vietą, aprašyta 1 ir 2 pavyzdžiuose.

Tokia kryptingo prijungimo chemija, naudojama išradimo konjugatams gauti, duoda kompozicijas, turinčias insulino molekulės konkrečios reaktyvios vietos didelį pakeitimo laipsnį. Po to, norint, šias kompozicijas galima dar gryninti, gaunant iš esmės grynus, mono- arba di-funkcinius PEG-insulinius.

Iš esmės gryna PEG-insulino kompozicija reiškia tokia, kuri apima PEG-insulino konjugatą, kuris yra mažiausiai maždaug 90 % grynas, geriau, mažiausiai 95 % grynas, tiriant bet kuriuo toliau paminėtų analitinių metodų. Šiuo požiūriu, grynumas reiškia PEG-insulino konjugato sudėtį. Kitaip tariant, PEG-insulino konjugatas mažiausiai maždaug 90 % grynumo, turi mažiausiai 90 % pagal masę PEG-insulino konjugato molekulių, tuo tarpu kiti maždaug 10 masės % reiškia priemaišas, kurios nėra PEG-insulino konjugatas. Būdingu atveju išradimo PEG-insulino konjugatai gryninami naudojant vieną ar daugiau gryninimo metodikų, tokių kaip jonų mainų chromatografiją, molekulinį sietų chromatografiją, afininę chromatografiją, hidrofobinių sąveikų chromatografiją ir atvirkštinių fazių chromatografiją. Susidariusio PEG-insulino (kai yra kelios insulino-PEG formos) bendras homogeniškumas gali būti įvertintas naudojant vieną ar daugiau iš šių metodų: chromatografiją, elektroforezę, masių spektroskopiją ir ypač MALDI-MS ir BMR spektroskopiją. Ypač naudingas insulino modifikavimo vietų nustatymui metodas yra RP-HPLC peptido išskleidimas kartu su USP identifikavimo testu žmogaus insulinui, naudojant endoproteinazę Glu-C (6 pavyzdys).

C. PEG-insulino konjugatų charakteristikos.

Pagal vieną išradimo aspektą pateikiami PEG-insulino konjugato kompozicijos, tinkamos įvedimui į plaučius. Kaip matyti iš pavyzdžiuose 7-11 pateiktų *in vivo* duomenų, išradimo PEG-insulino konjugatai, įvedus į plaučius, pasižymi geresnėmis farmakokinetinėmis ir farmakodinaminėmis savybėmis, lyginant su natyviu insulinu. Parodyta, kad insulinas gali būti modifikuojamas PEG, turinčiais molekulinę masę iki 5000-10000 K arba didesnę, ir vis dar išlaikyti aktyvumą. Pavyzdinio PEG-insulino

konjugato 5K-PEG-insulino aktyvumas parodytas 7 pavyzdyje. Be to, kaip matyti iš čia pateikiamų pavyzdžių, pavyzdinis PEG-insulino konjugatas, turintis PEG grandines vidutinės molekulinės masės ribose nuo 750 daltonų iki 2000 daltonų, iki 5000 daltonų, įvedus tiek intraveniniu būdu, tiek į plaučius, yra bioaktyvus, iš esmės neužsibūna plaučiuose, įvedus į plaučius, kas parodyta nustatytais serumo insulino kiekiais, ir yra efektyvus, iš esmės sumažinant gliukozės kiekį (7-11 pavyzdžiai), kas kai kuriais atvejais trunka laiko tarpą, žymiai ilgesnį, nei stebima natyvaus insulino atveju. Be to, čia pateikiami PEG-insulino konjugatai, kurie, įvedus į plaučius, demonstruoja greitą veikimo pradžią (1 val. bėgyje nuo įvedimo). Šio išradimo pavyzdinių PEG-insulino kompozicijų farmakokinetiniai ir farmakodinaminiai parametrai pateikti 13 lentelėje.

Aplamai, išradimo PEG-insulino kompozicija pasižymi vien ar daugiau iš šių charakteristikų. PEG-insulino konjugatai išlaiko mažiausiai išmatuojamą specifinį aktyvumą. Kitaip tariant, PEG-insulino konjugatas pagal šį išradimą pasižymi nuo maždaug 2 % iki maždaug 100 % ar daugiau natyvaus insulino specifinio aktyvumo. Viename išradimo įgyvendinime, kuriam teikiama pirmenybė, PEG-insulino konjugatas pasižymi mažiausiai 10 % ar daugiau nemodifikuoto natyvaus insulino biologinio aktyvumo, ir yra iš esmės neimunogeninis. Geriau, kai išradimo konjugato bioaktyvumas svyruoja nuo maždaug 5 % iki maždaug 20 % ar daugiau nuo natyvaus insulino bioaktyvumo. Konjugato pagal šį išradimą bioaktyvumas gali būti charakterizuotas ir netiesiogiai, pvz., stebint kraujo gliukozės ir insulino kiekius, gaunant farmakodinaminis ir/arba farmakokinetinius duomenis, arba radioimuniniu metodu (RIA).

Insulino koncentracijų serume požiūriu, įvedus PEG insulino konjugatą, pvz., į plaučius, čia aprašytas konjugatas būdingu atveju duoda smailę (t.y., pasiekia Cmax arba aukščiausią koncentracijos kreivės vietą) apie po maždaug 2-8 valandų nuo įvedimo, būdingesniu atveju, po maždaug 3-6 valandų ar panašiai. Be to, išradimo chemiškai modifikuoti insulini ir , konkrečiai, čia aprašytos prailginto veikimo insulino vaisto formos yra efektyvūs užtikrinant tiek išmatuojamą gliukozės kiekio mažinimo poveikį, tiek užlaikytas insulino koncentracijas ilgesnį laiko tarpą, nei natyvus insulinas. Konkrečiau, PEG-insulino konjugatas, įvedus į plaučius, demonstruoja padidintą insulino kiekį (padidintą virš bazinio arba foninio kiekio) mažiausiai 6 valandas ir, geriau, mažiausiai 8 valandas po įvedimo. Geriau, kai PEG-insulino konjugatas, įvedus į plaučius, duoda didesnius insulino kraujyje kiekius ilgą laiko tarpą mažiausiai 9 valandas, 10

valandų, 12 valandų arba mažiausiai 14 valandų po įvedimo, kur aukščiau minėti baziniai insulino konjugato kiekiai yra išmatuojami kraujyje. Pavyzdinės kompozicijos, pasižyminčios šiais požymiais, pateikiamos pavyzdžiuose.

Kaip aprašyta anksčiau, išradimo insulino konjugatai efektyviai mažina gliukozės kiekį kraujyje. Kalbant apie išradimo kompozicijų gebėjimą sureguliuoti kraujo gliukozės kiekį, tai PEG insulino konjugatai, įvedus, pvz., į plaučius, yra efektyvūs, kad sureguliuotų kraujo gliukozės kiekį iki žemesnio už foninį mažiausiai 6 val. po įvedimo. Konkrečiau, PEG insulino kompozicija pagal šį išradimą yra efektyvi sureguliuoti kraujo gliukozės kiekį iki žemesnio už foninį mažiausiai 8 val., geriau, mažiausiai 10 val., arba, dar geriau, mažiausiai 12 val. ar daugiau po įvedimo.

Be to, Išradimo PEG-insulino vaisto formos pasižymi absoliučiu bioprieinamumu per plaučius, geresniu nei natyvaus insulino. Konkrečiai, čia pateiktos PEG-insulino kompozicijos pasižymi absoliučiu bioprieinamumu per plaučius, kuris yra bent maždaug 1,2 karto didesnis nei natyvaus insulino, geriau, mažiausiai maždaug 1,5 karto didesnis nei natyvaus insulino, dar geriau, mažiausiai maždaug 2 kartus didesnis nei natyvaus insulino ir netgi dar geriau, mažiausiai maždaug 2,5 ar 3 kartus didesnis nei natyvaus insulino. (tai iliustruojantys rezultatai pateikti 13 lentelėje).

III. Vaisto formos

Šio išradimo polimero-insulino konjugato kompozicijos gali būti įvedamos grynos arba terapinėse/farmacinėse kompozicijose, turinčiose papildomų užpildų, tirpiklių, stabilizatorių ir t.t., priklausomai nuo konkretaus įvedimo būdo ir dozavimo formos. Šie konjugatai gali būti įvedami tiek parenteraliai, tiek n parenteraliai. Specifiniai įvedimo būdai apima peroralinį, rektalinį, bukalinį, vietinį, nazalinį oftalminį, subkutaninį būdus, įvedimą į raumenis, intraveninį, transderminį būdą ir įvedimą į plaučius. Labiausiai tinkamas yra parenteralinis būdas ir įvedimo į plaučius būdas.

Farmacinė kompozicijos, skirtos žinduoliams ir, geriau, žmonėms, tipiniu atveju apima mažiausiai vieną šio išradimo PEG-insulino konjugatą, kartu su vienu ar daugiau farmacinio požiūriu priimtinių nešiklių, kas bus detaliau aprašyta žemiau, ypač kompozicijoms į plaučius. Šio išradimo vaisto formos, pvz., parenteraliniam įvedimui, bendriausiu atveju yra skysčiai arba milteliai, kai miltelių vaisto formai dažniausiai

teikiama pirmenybė. Papildomos, nors ir mažiau tinkamos šio išradimo chemiškai modifikuotų insulinų kompozicijos apima sirupus, kremus, tepalus, tabletes ir pan.

Vaisto formos ir atitinkamos insulino dozės kinta priklausomai nuo naudoto insulino bioaktyvumo koncentracijos. Injekuojamas insulinas matuojamas USP insulino vienetais ir USP insulino žmogaus vienetais (U); vienas insulino vienetas lygus kiekiui, kurio reikia sumažinti badaujančio triušio kraujo gliukozės koncentraciją iki 45 mg/dl (2,5 mM). Tipinės insulino preparatų injekcijoms koncentracijos varijuoja 30-100 vienetų/ml ribose, kas yra maždaug 3,6 mg insulino/ml. Insulino kiekis, reikalingas pasiekti norimą fiziologinį efektą pacientui, skirsis priklausomai ne tik nuo paciento ir jo ligos bruožų (pvz., I tipo ar II tipo diabetas), bet taip pat nuo naudoto insulino stiprumo ir konkretaus tipo. Pavyzdžiui, dozavimo intervalas įprastam insulinui (greitai veikiantis) yra nuo maždaug 2 iki 0,3 U insulino kilogramui kūno masės per dieną. Vienu aspektu, išradimo kompozicijos yra efektyvios pasiekti gydomuose pacientuose kraujo gliukozės koncentraciją badaujant tarp maždaug 90 ir 140 mg/dl ir pavalgius, mažiau nei 250 mg/dl. Tikslios dozės gali būti nustatytos šios srities specialistų, turint konkretaus insulino konjugato, naudojamo konkrečiu įvedimo būdu, farmakodinamiką ir farmakokinetiką, ir gali būti lengvai nustatytos iš periodinio gliukozės kiekio stebėjimo.

Individualus dozavimas (skaičiuojant vienam įkvėpimui) inhaliuojamų insulino konjugato vaisto formų atveju paprastai yra intervale nuo maždaug 0,5 mg iki 15 mg insulino konjugato, kur norima visa dozė paprastai pasiekama per maždaug 1-10 įkvėpimų, geriau, per 1-4 įkvėpimus. Vidutiniškai visa PEG-insulino dozė, įvedama inhaliuojant per dozavimo sesiją svyruoja nuo maždaug 10 U iki maždaug 400 U, kai kiekviena individuali ar vienetinė dozė (atitinkanti vienam įkvėpimui) turi nuo maždaug 5 U iki 400 U.

A. Chemiškai modifikuoto insulino inhaliuojamos vaisto formos

Kaip parodyta aukščiau, vienas iš tinkamų šio išradimo insulino konjugatų įvedimo būdas yra įkvepiant į plaučius. Dabar pilniau aprašysime konkrečius vaisto formos komponentus, charakteristikas ir įvedimo įtaisus.

Insulino konjugato kiekis vaisto formoje bus tas kiekis, kurio reikia įvesti terapiškai efektyvų insulino kiekį per vienetinę dozę, kad būtų gautas natyvaus insulino terapinis poveikis, t.y., gebėjimas sureguliuoti kraujo gliukozės kiekį iki beveik normalaus.

Praktiškai jis varijuoja plačiose ribose, priklausomai nuo konkretaus insulino konjugato, jo aktyvumo, gydomos diabetinės būklės rimtumo, pacientų populiacijos, vaisto formos stabilumo ir pan. Kompozicija paprastai turi nuo maždaug 1 masės % iki maždaug 99 masės % PEG-insulino, tipiniu atveju nuo maždaug 2 masės % iki maždaug 95 masės % konjugato, ir tipiškiausiu atveju nuo maždaug 5 masės % iki maždaug 85 masės % konjugato, ir taip pat priklauso nuo santykinio užpildų/priedų kiekio, esančio kompozicijoje. Konkrečiau, kompozicija tipiniu atveju turi bent vieną masės procentinį kiekį PEG-insulino iš šių: 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % arba daugiau. Geriausia, kad miltelių kompozicijos turėtų mažiausiai 60 %, pvz., nuo maždaug 60-100 masės % PEG-insulino. Suprantama, kad į čia aprašytas vaisto formas gali būti įterptas daugiau nei vienas insulinas, ir kad termino "agentas" arba "insulinas" panaudojimas jokių būdu neatmeta dviejų ar daugiau insulinų arba insulino derinio su kitu aktyviu agentu panaudojimo. (Pavyzdžiui, iliustracinė PEG-insulino vaisto forma taip pat gali apimti natyvų insuliną).

A.1. Užpildai.

Išradimo kompozicijos daugeliu atvejų turi vieną ar daugiau užpildų. Tinkami yra karbohidratų užpildai, tiek vieni, tiek derinyje su kitais užpildais arba priedais. Karbohidratų, naudojamų šio išradimo kompozicijose, pavyzdžiai apima cukrus, derivatizuotus cukrus, tokius kaip alditoliai, aldono rūgštys, esterinti cukrai, cukrų polimerai. Užpildų, tinkamų naudoti pagal šį išradimą pavyzdžiai apima, pavyzdžiui, monosacharidus, tokius kaip fruktozė, maltozė, galaktozė, gliukozė, D-manozė, sorbozė ir panašiai; disacharidus, tokius kaip laktozė, sacharozė, trehalozė, celobiozė ir panašiai; polisacharidus, tokius kaip rafinozė, melezitozė, maltodekstrinai, dekstranai, krakmolai ir panašiai; alditoliai, tokie kaip manitolis, ksilitolis, maltitolis, laktitolis, ksilitolis, sorbitolis (gliucitolis), piranozilsorbotolis, mioinozitolis ir panašiai. Tinkamesni yra neredukuojantys cukrai, cukrai, galintys sudaryti iš esmės sausą amorfinę arba stiklišką fazę derinyje su insulino konjugatu, ir cukrai, pasižymintys santykinai aukšta Tgs (pvz., Tgs didesnė nei 40 °C, geriau, didesnė nei 50 °C, dar geriau, didesnė nei 60 °C, netgi dar geriau, didesnė nei 70 °C ir, geriausia, turintys Tgs 80 °C ir daugiau).

Papildomi užpildai apima aminorūgštis, peptidus ir ypač oligomerus, apimančius 2-9 aminorūgštis, geriau 2-5 narių oligomerus, ir polipeptidus, visi iš jų gali būti homo arba

hetero pobūdžio. Aminorūgščių atstovai apima gliciną (gly), alaniną(ala), valiną (val), leuciną (leu), izoleuciną (ile), metioniną (met), protiną (pro), fenilalaniną(phe), triptofaną, seriną (ser), treoniną (thr), cisterną (cys), tiroziną (tyr), asparaginą (asp), glutamo rūgštį (glu), liziną (lys), argininą (arg), histidiną (his), norleuciną (nor) ir jų modifikuotas formas. Ypač tinkama aminorūgštis yra leucinas.

Taip pat tinkami naudoti kaip užpildai inhaliuojamose kompozicijose yra di- ir tri-peptidai, turintys dvi ar daugiau leucilo liekanas, kaip aprašyta Inhale Therapeutic System tarptautinėje patentinėje paraiškoje PCT/US00/09785, kuri čia įtraukta visumoje kaip nuoroda.

Taip pat tinkami yra di- ir tri-peptidai, turintys stiklėjimo perėjimo temperatūrą aukštesnę nei maždaug 40 °C, geriau, aukštesnę nei 50 °C, netgi dar geriau, aukštesnę nei 60 °C ir geriausia, aukštesnę nei 70 °C.

Tačiau dėl savo riboto tirpumo vandenyje mažiau tinka papildomą stabilumą ir aerozolio savybes stiprinantys peptidai 4 ir 5 narių oligomerai, turintys bet kokią aukščiau aprašytą aminorūgščių derinį. Geriau, kai 4 ar 5 narių oligomerai apima dvi arba daugiau leucino liekanas. Leucino liekanos peptide gali užimti bet kokią vietą, tuo tarpu kai likusios (t.y., ne leucilo) aminorūgščių vietos užimamos bet kokia aukščiau aprašyta aminorūgštimi, su sąlyga, kad susidaręs 4 ar 5 narių oligomeras pasižymi tirpumu vandenyje bent jau maždaug 1 mg/ml. Geriausia, kai ne leucilo aminorūgštys 4 ar 5 narių oligomere yra hidrofilinės, tokios kaip lizinas, tokiu būdu didinant peptido tirpumą vandenyje.

Poliaminorūgštys, ir ypač tos, kurios turi bet kurias čia aprašytas aminorūgštis, taip pat yra tinkamos naudoti stabilizatoriais. Tinkamesnės yra poliaminorūgštys, tokios kaip polilizinas, poliglutamato rūgštis ir poli (lys, ala).

Papildomi užpildai ir priedai, tinkami čia pateiktose kompozicijose ir metoduose, apima, bet jais neapsiriboja, baltymus, ne biologinius polimerus ir biologinius polimerus, kurie gali būti pavieniui arba derinyje. Tinkami užpildai yra tokie, kaip pateikta Inhale Therapeutic System tarptautinėje publikacijoje Nr. WO 96/32096 ir 98/16205. Tinkamesni yra užpildai, turintys stiklėjimo perėjimo temperatūrą (Tg) virš maždaug 35 °C, geriau, virš maždaug 40 °C, dar geriau, virš 45 °C, geriausia virš maždaug 55 °C.

Baltyminių užpildų pavyzdžiai apima albuminus, tokius kaip žmogaus serumo albuminas (HSA), rekombinantinis žmogaus albuminas (rHA), želatiną, kazeiną,

hemoglobina ir pan. Kompozicijos taip pat gali turėti buferį arba pH reguliuojantį agentą, tipiškai, bet nebūtinai druską, gautą iš organinės rūgšties arba bazės. Buferių pavyzdžiai apima organinių rūgščių druskas: citrinų rūgšties, askorbo rūgšties, gliukono rūgšties, anglies rūgšties, vyno rūgšties, gintaro rūgšties, acto rūgšties arba ftalio rūgšties. Kiti tinkami buferiai apima Tris, trometamino hidrochlorido, borato, glicerolio fosfato ir fosfato. Aminorūgštys, tokios kaip glicinas, taip pat tinka.

Išradimo kompozicijos taip pat gali apimti papildomus polimerinius užpildus/priedus, pvz., polivinilpirolidonus, derivatizuotas celiuliozes, tokias kaip hidroksimetilceliuliozė, hidroksietilceliuliozė ir hidroksipropilceliuliozė, Fikoliai (polimeriniai cukrai), hidroksietilkrakmolai (HES), dekstratai (pvz., ciklodekstrinai, tokie kaip 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinas ir sulfobutileterio β -ciklodekstrinas), polietilenglikoliai ir pektinas.

Kompozicijos dar gali apimti aromatinius agentus, skonį maskuojančius agentus, neorganines druskas (pvz., natrio chloridą), antimikrobinius agentus (pvz., benzalkonio chloridą), saldiklius, antioksidantus, antistatinus agentus, paviršinio aktyvumo medžiagas (pvz., polisorbatus, tokius kaip "TWEEN 20" ir "TWEEN 80", ir poloksamerus, tokius kaip F68 ir F88, gaminamus BASF, sorbitano esterius, lipidus (pvz., fosfolipidus, tokius kaip lecitinas ir kiti fosfatidilcholinai, fosfatidiletanolaminai, nors geriau ne liposomų pavidale), riebalų rūgštis ir riebalų rūgščių esterius, steroidus (pvz., cholesterolį), ir kompleksonus (pvz., EDTA, cinko ir kitus tokius tinkamus katijonus). Dipakeistų fosfatidilcholinų panaudojimas perforuotų mikrostruktūrų (t.y., tuščiavidurių, poringų mikrosferų) gamybai aprašyta detaliau žemiau. Kiti farmaciniai užpildai ir/arba priedai, tinkantys naudoti šio išradimo kompozicijose, išvardinti "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), ir "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998).

Pagal vieną įgyvendinimą, kompozicija pagal šį išradimą gali neturėti skvarbumo sustiprintojų, kurie gali sąlygoti sudirginimą ir yra toksiški didelėmis koncentracijomis, kurių dažnai reikia esminiam absorbcijos pagerinimui. Specifiniai sustiprintojai, kurių gali nebūti šio išradimo kompozicijose, yra i detergentus panašūs sustiprintojai, tokie kaip deoksicholatai, laureth-9, DDPC, glikocholatas ir fusidatai. Tačiau kai kurie sustiprintojai, tokie kaip saugantys insulina nuo fermentinio degradavimo, pvz., proteazės ir peptidazės inhibitoriai, tokie kaip alfa-1 antiproteazė, kaptoprilis, tiorfanis, ir ŽIV proteazės

inhibitoriai, kai kuriuose išradimo įgyvendinimuose gali būti įtraukti į išradimo PEG-insulino vaisto formas. Dar kitame išradimo įgyvendinime PEG-insulino konjugatai gali neturėti liposomų, lipidinių matricų ir kapsuliavimo agentų.

Bendru atveju, šio išradimo farmacinės kompozicijos turi nuo maždaug 1 masės % iki maždaug 99 masės % užpildo, geriau, maždaug 5-98 masės % užpildo, dar geriau maždaug 15-95 masės % užpildo. Netgi dar geriau, kad purškiant išdžiovinta kompozicija turi maždaug 0-50 masės % užpildo, dar geriau, 0-40 masės % užpildo. Aplamai, galutinėje farmacinėje kompozicijoje pageidautinos aukštos insulino koncentracijos. Tipiniu atveju optimalus užpildo/priedo kiekis nustatomas eksperimentiškai, t.y., gaminant kompozicijas, turinčias skirtingus užpildo kiekius (varijuojančius nuo žemo iki aukšto), tiriant farmacinių kompozicijų cheminį bei fizinį PEG-insulino stabilumą, MMAD ir dispersiškumą, ir tada panaudojant intervalą, kuriame gaunamos optimalios aerozolio savybės be jokios neigiamos įtakos insulino stabilumui.

A.2. Sausų miltelių gamyba.

Šio išradimo sausų miltelių vaisto formos, apimančios PEG-insulino konjugatą, gali būti pagamintos bet kuriuo iš daugelio džiovinimo metodikų, geriausia, džiovinimu purškiant. Vaisto formos džiovinimas purškiant vykdomas, pavyzdžiui, kaip bendrai) ir aprašyta "Spray Drying Handbook", 5th ed., K.Masters, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1991), ir Platz R., *et al.*, tarptautinėse publikacijose WO 97/41833 ir WO 96/32149 (1996), kurių turinys čia cituojamas.

PEG-insulino konjugatų tirpalai džiovinami įprastiniame įrenginyje, tokiaime kaip pardavinėjamų Niro A/S (Danija), Buchi (Šveicarija) ir pan., gaunant disperguojamus sausus miltelius. PEG-insulino tirpalų džiovinimo purškiant optimalios sąlygos priklauso nuo vaisto formos komponentų, ir daugeliu atvejų yra nustatomos eksperimentiškai. Dujos, naudojamos džiovinime purškiant, paprastai yra oras, nors inertinės dujos, tokios kaip azotas arba argonas, taip pat tinka. Be to, dujų, naudojamų purškiamos medžiagos džiovinimui, temperatūra tiek įėjime, tiek išėjime yra tokia, kad nesukelia PEG-insulino degradacijos išpurkštoje medžiagoje. Ši temperatūra paprastai nustatoma eksperimentiškai, nors bendru atveju, įėjimo temperatūra svyruoja nuo maždaug 50 °C iki maždaug 200 °C, tuo tarpu išėjimo temperatūra svyruoja nuo maždaug 30 °C iki maždaug 150 °C. Tinkami parametrai apima atomizacijos slėgį maždaug 20-150 psi ribose, geriau, nuo maždaug 30-

40 iki 100 psi. Tipiniu atveju naudojamas atomizacijos slėgis yra vienas iš šių (psi): 20, 30, 40,, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 arba aukštesnis.

Įkvepiamos PEG-insulino kompozicijos, turinčios čia aprašytas savybes, taip pat gali būti pagamintos išdžiovinant tam tikrus vaisto formos komponentus, kas duoda perforuotos mikrostruktūros miltelius, kaip aprašyta WO 99/16419, kurio visas turinys čia cituojamas. Perforuotos mikrostruktūros milteliai paprastai apima išdžiovintas purškiant tuščiavidures mikrosferas, turinčias santykinai plonas poringas sienėles, apibrėžiančias didelę vidinę ertmę. Perforuotos mikrostruktūros milteliai gali būti disperguojami pasirinktoje suspensijos terpėje (tokioje kaip nevandeninis ir/arba fluorintas pūtimo agentas), siekiant gauti stabilias dispersijas prieš džiovinimą. Santykinai mažo tankio perforuotos (arba poringos) mikrostruktūros mikrodalelių panaudojimas žymiai sumažina traukos tarp dalelių jėgą, tokiu būdu sumažinant sukibimo jėgą ir padidinant susidariusių miltelių takumą ir dispersiškumą, ir sumažinant jų stabilios dispersijos degradaciją dėl flokuliacijos, sedimentacijos arba išsisluoksniavimo.

Alternatyviai, PEG-insulino kompozicijos įvedimui į plaučius gali turėti aerodinamiškai lengvas daleles, kaip aprašyta patente US 6136295.

Išradimo miltelių vaisto formos taip pat gali būti pagamintos liofilizuojant, džiovinant vakuume, džiovinant purškiant šaltyje, apdorojant superkritinį skystį (pvz., kaip aprašyta Hanna *et al.*, patente US 6063138) džiovinant ore arba kitais džiovinimo garinant būdais.

Dar kitu aspektu, sausi milteliai gali būti pagaminti aglomeruojant miltelių komponentus, sijoiant medžiagas, kad gautų aglomeratus, suteikiant rutulio formą, kad gautų labiau sferinius aglomeratus ir atrenkant pagal dydį, kad gautų vienodo dydžio produktą, kaip aprašyta, pvz., Ahlneck C., *et al.*, tarptautinėje publikacijoje WO 95/09616, 1995, kuri čia cituojama.

Sausi milteliai taip pat gali būti pagaminti vaisto formos komponentus sumaišant, trinant, sijoiant arba malant čiurkšliniu malūnu iki sausų miltelių pavidalo.

Sumaišius, sausų miltelių kompozicijos geriausia laikomos sausose (t.y., santykinai žemo drėgnumo) sąlygose, kol trunka gamyba, apdorojimas ir saugojimas. Nepriklausomai nuo naudoto džiovinimo būdo, gaunamos inhaliuojamos didelio dispersiškumo dalelės, apimančios chemiškai modifikuotą insuliną kaip čia aprašyta.

A.3. Sausų miltelių vaisto formų ypatybės.

Išradimo milteliai dar apibūdinami keletu ypatybių, ypač viena ar daugiau iš šių: (i) pastoviai didelis dispersiškumas, kuris palaikomas netgi saugant, (ii) mažas aerodinaminis dalelių dydis (MMAD), (iii) geresnė mažų dalelių dozės charakteristika, t.y., milteliai, turintys didesnę procentą mažesnių nei 3,3 mikronų MMAD dalelių, ir visa tai prisideda padidinant miltelių gebėjimą įsiskverbti į žemesniųjų kvėpavimo takų (t.y., alveolių) audinius, kad patektų į kraujo apytaką. Šios išradimo inhaliuojamų miltelių fizinės charakteristikos, kurios bus pilniau aprašytos toliau, yra svarbios didinant tokių miltelių aerozolio pavidale pristatymo į gilesnius plaučių sluoksnius efektyvumą.

Išradimo sausieji milteliai yra sudaryti iš aerosolizuojamų dalelių, galinčių įsiskverbti į plaučius. Išradimo dalelės turi vidutinį masės diametrą (MMD) mažesnę nei maždaug 20-30 μm , arba mažiau nei maždaug 10 μm , geriau, mažiau nei maždaug 7,5 μm , dar geriau mažiau nei maždaug 4 μm , ir netgi mažiau nei maždaug 3,5 μm , paprastai 0,1-5 μm intervale. Tinkamiausi milteliai yra sudaryti iš dalelių, turinčių MMD nuo maždaug 0,2 iki 4,0 μm . Kai kuriais atvejais milteliai taip pat turi neįkvepiamų nešiklio dalelių, tokių kaip laktozė, kur neįkvepiamos dalelės paprastai yra didesnės nei 40 mikronų.

Milteliai pagal šį išradimą dar charakterizuojami aerozolio dalelių dydžio pasiskirstymu, mažesniu nei maždaug 10 μm masės vidurinio aerodinaminio diametru (MMAD), geriau turinčių MMAD mažesnę nei maždaug 5 μm , dar geriau mažesnę nei 4,0 μm , netgi dar geriau mažesnę nei 3,5 μm , ir, geriausia, mažesnę nei 3 μm . Charakteringu atveju masės vidurinis aerodinaminis diametras kinta nuo maždaug 0,1-10 μm , geriau nuo maždaug 0,2-5,0 μm MMAD, dar geriau nuo maždaug 0,1-4,0 μm ir netgi dar geriau nuo maždaug 1,5 iki 3,0 μm . Maži aerodinaminiai diametrai bendru atveju pasiekiami derinant optimizuotas džiovinimo purškiant sąlygas ir užpildų bei jų koncentracijos parinkimą.

PEG-insulino milteliai pagal šį išradimą dar gali būti charakterizuojami jų tankiu. Miltelių kompozicija inhaliavimui paprastai pasižymi bendru tankiu nuo maždaug 0,1 iki 10 g/cm^3 , geriau nuo maždaug 0,1-2 g/cm^3 ir dar geriau, nuo maždaug 0,15-1,5 g/cm^3 .

Milteliai paprastai turi drėgmės kiekį mažesnę nei 20 masės %, paprastai mažiau nei maždaug 10 masės %, ir geriau, mažiau nei maždaug 5 masės %. Pagal šį išradimą tinkamesni yra milteliai, turintys drėgmės kiekį, žemesnę nei maždaug vienas iš šių masės

%, 15 %, 10 %, 7 %, 5 %, arba 3 %. Tokios mažai drėgmės turinčios kietos medžiagos turi tendenciją būti stabilesnės pakuojant ir saugant.

Be to, čia aprašyti džiovinimo purškiant būdai ir stabilizatoriai yra efektyvūs sukuriant didelio dispersiškumo PEG-insulino vaisto formas. Miltelių vaisto formos atveju emituojama šių miltelių dozė (ED) tipiniu atveju yra didesnė nei 30 %, ir paprastai didesnė nei 40 %. Geriau, kad išradimo miltelių ED yra didesnė nei 50 %, dažnai didesnė nei 60 %.

Čia aprašytos kompozicijos taip pat pasižymi geru stabilumu, tiek kalbant apie cheminį stabilumą, tiek apie fizinį, t.y., aerozolio stabilumą laike. Bendru atveju, kalbant apie cheminį stabilumą, vaisto formoje esantis PEG-insulino konjugatas degraduoja ne daugiau nei 15 %, džiovinant purškimu. Kitaip tariant, milteliai turi mažiausiai 85 % nepažeisto PEG-insulino konjugato, geriau mažiausiai 90 arba 95 % nepažeisto konjugato, ir dar geriau, mažiausiai 97 % ar daugiau nepažeisto PEG-insulino. Geriau, kai džiovinimas purškiant duoda miltelius, turinčius mažiau nei 10 % bendro kiekio baltymo agregatų, kitaip tariant, daugiau nei 90 % chemiškai modifikuoto insulino masės yra monomero pavidale.

Kalbant apie aerozolio charakteristiką, šio išradimo kompozicijos paprastai charakterizuojamos emituojamos dozės sumažėjimu ne daugiau kaip maždaug 20 %, geriau ne daugiau kaip maždaug 15 %, ir dar geriau, ne daugiau kaip maždaug 10 % saugant tris mėnesius vidutinėse sąlygose.

A.4. Kompozicijų įvedimas.

Čia aprašytos PEG-insulino vaisto formos gali būti įvestos, naudojant bet kurį tinkamą sausų miltelių inhaliatorių (DPI), t.y., inhaliavimo įtaisą, kuris naudoja paciento įkvėpimą kaip sausų miltelių vaisto transportavimo į plaučius priemonę. Tinkami yra Inhale Therapeutic Systems firmos sausų miltelių inhaliavimo įtaisai, aprašyti Patton J.S. *et al.*, patente US 5458135, 1995.10.17; Smith A.E. *et al.*, patente US 5740794, 1998.04.21; ir Smith A.E. *et al.*, patente US 5785049, 1998.07.28, kurie čia cituojami. Miltelių pavidalo medikamentai, įvesti šio tipo įtaisais, yra laikomi talpykloje, turinčioje praduriamą dangtelį arba kitą priėjimo paviršių, geriau, pūslelių pakuotę arba kasetę, kur talpykla gali turėti vieną dozavimo vienetą arba daug dozavimo vienetų. Įprastiniai didelio skaičiaus vienetų (t.y., dozavimo vienetų pakuotės) užpildymo kalibruotomis sausų miltelių

medikamento dozėmis metodai yra aprašyti, pvz., Parks D.J., *et al.*, tarptautinėje publikacijoje WO 97/41031, 1997.11.06), kuri čia cituojama.

Kiti sausų miltelių dispersijos įtaisai sausų miltelių įvedimui į plaučius apima aprašytus, pavyzdžiui, Newell R.E. *et al.*, patente EP 129985, 1988.09.07; Hodson P.D. *et al.*, patente EP 472598, 1996.07.03, Cocozza S. *et al.*, patente EP 467172, 1994.04.06 ir Lloyd L.J. *et al.*, patente US 5522385, 1996.06.04, kurie čia cituojami. PEG-insulino sausųjų miltelių įvedimui taip pat tinka tokie įtaisai, kaip Astra-Draco "TURBUHALER". Šio tipo įtaisas detalčiai aprašytas Virtanen R., patente US 4668218, 1987.05.26; Wetterlin K., *et al.*, patente US 4667668, 1987.05.26 ir Wetterlin K., *et al.*, patente US 4805811, 1989.02.21, kurie visi čia cituojami. Kiti tinkami įtaisai apima sausųjų miltelių inhaliatorius, tokius kaip Rotahaler® (Glaxo), Discus® (Glaxo), Spiros™ (Dura Pharmaceuticals) ir Spinhaler® (Fisons). Taip pat tinka įtaisai, naudojantys stūmoklį oro tiekimui arba pakraunant miltelių pavidalo medikamentą, pakeliant medikamentą nuo nešiklio plokštumos, praleidžiant orą per plokštumą, arba sumaišant orą su vaisto milteliais sumaišymo kameroje ir nuosekliai įvedant miltelius pacientui per įtaiso kandiklį, kaip aprašyta Mulhauser P., *et al.*, patente US 5388572, 1997.09.30, kuris čia cituojamas.

Inhaliuojamos PEG-insulino kompozicijos taip pat gali būti įvestos naudojant suspausto oro, kalibruotos dozės inhaliatorių (MDI), pvz., Ventolin® kalibruotos dozės inhaliatorių, turintį vaisto tirpalą arba suspensiją farmaciniu požiūriu inertiškame skystame disperguojančiame agente, pvz., anglies chlorfluoride arba anglies fluoride, kaip aprašyta Laube *et al.*, patente US 5320094, 1994.06.14 ir Rubsamen R.M. *et al.*, patente US 5672581 (1994), jie abu čia cituojami.

Alternatyviai, čia aprašyti PEG-insulinai gali būti ištirpinti arba suspenduoti tirpiklyje, pvz., vandenyje arba natrio chlorido tirpale, ir įvedami purškiant. Puršikliai aerozoliu paversto tirpalo įvedimui apima AERX™ (Aradigm), Ultravent™ (Mallinkrodt), Pari LC Plus™ arba Pari LC Star™ (Pari GmbH, Vokietija), DeVilbiss Pulmo-Aide ir Acorn II® (Marquest Medical Products).

Kaip pažymėta anksčiau, čia aprašyti PEG-insulino konjugatai taip pat gali būti įvedami parenteraliai intraveninės injekcijos būdu, arba, kas mažiau tinka, injekcijos į raumenis arba po oda būdu. Tos srities specialistai lengvai nustatys tikslius tokios vaisto formos komponentus. Parenteraliniam įvedimui tinkamos vaisto formos apima gatavus injekcijų tirpalus, sausus miltelius, skirtus ištirpinti tirpiklyje prieš pat naudojimą, gatavas

suspensijas injekcijoms, sausas netirpias kompozicijas, skirtas sumaišymui su nešikliu prieš pat naudojimą, emulsijas ir skystus koncentratų, skirtus praskiesti prieš pat įvedimą. Pavyzdžiui, PEG-insulino kompozicijos pagal šį išradimą injekuojamas tirpalas gali apimti kompoziciją, ištirpintą vandeniniame nešiklyje, tokiame kaip vandeninis natrio chloridas, Ringerio tirpalas, dekstrozės injekcijų tirpalas, Ringerio tirpalas su laktatu ir pan., ir gali apimti vieną ar daugiau farmaciniu požiūriu suderinamų užpildų arba priedų, aprašytų aukščiau.

IV. Naudingumas.

Šio išradimo kompozicijos, įvestos žinduoliui bet kuriuo tinkamu įvedimo būdu, geriausia, inhaliuojant arba infekuojant, terapiniu požiūriu efektyviu kiekiu, yra tinkamos gydyti diabetui, konkrečiai, I tipo arba II tipo diabetui.

Čia nurodyti straipsniai, knygos, patentai ir kitos publikacijos savo visa apimtimi yra įtraukti čia kaip citatos.

Toliau pateikti pavyzdžiai iliustruoja išradimą, bet jokių būdu nesiekia apriboti išradimo apimties.

PAVYZDŽIAI

Medžiagos ir metodai

Polietilenglikolio reagentas gautas iš Shearwater Corporation (Huntsville, Alabama).

Žmogaus insulinas gautas iš Diosynth, Inc.

1 pavyzdys

Di-N^{αA1}, N^{εB29}-t-Boc-Insulinas

Kompozicija, sudaryta visų pirma iš mono-pegilinto insulino, buvo pagaminta specifinio surišimo vietos atžvilgiu būdu, kaip išdėstyta 1 ir 2 pavyzdžiuose, naudojant tiesios grandinės 5000 Daltonų polietilenglikolį.

Pirmiausia pagamintas di-apsaugotas insulinas tokiu būdu: 602 mg žmogaus insulino (0,103 mmol) ištirpinta 3,0 ml bevandenio dimetilsulfoksido (DMSO), turinčiame 166 μl trietilamino. Į insulino tirpalą pridėta 50 μl di-tret-butildikarbonato (0,215 mmol). Po 60 min. stovėjimo kambario temperatūroje reakcijos mišinys išpiltas į 240 ml acetono, po to

pridėta 3 lašai 6 M HCl, kad prasidėtų flokuliacija. Nuosėdos atskirtos filtruojant ir išdžiovintos vakuume. Reakcijos produktas išgrynintas preparatyvinės HPLC pagalba, naudojant Waters 25x100 mm C18 kolonėlę (vidutinis dalelių dydis 15 μm , porų dydis 100 Å). Eliuents naudoti acetonitrilo ir 0,1 % TFA mišiniai dejonizuotame vandenyje, greitis 3,0 ml/min. Produktas surinktas, distiliuota pašalinant acetonitrilą ir tada liofilizuotas. Išeiga 164,8 mg (26,7 %, mol.masė apie 6000 pagal MALDI).

2 pavyzdys

Mono-pegilinto mPEG-5K-SPA-PheB1-insulino konjugato sintezė

N^{αB1}-metoksipoli(etilenglikol)5K-insulinas (mPEG5K-PheB1-insulinas)

150 mg (apie 0,025 mmol) šviežiai išvalyto di-N^{αA1}, N^{εB29}-t-Boc-insulino iš 1 pavyzdžio ištirpinta 4 ml DMSO, turinčiame 95 μl trietilamino. Į insulino tirpalą pridėta 169 mg (0,032 mmol) mPEG-SPA-5000 (mPEG-sukcinimidilpropionato, mPEG-O-CH₂CH₂C(O)O-sukcinimido, mol. masė 5000). Inkubuota per naktį (29 val.) kambario temperatūroje, po to susidaręs mPEG-insulino darinys praskiestas iki 100 ml dejonizuotu vandeniu, dializuotas prieš vandenį 4 val. ir po to liofilizuotas. Liofilizuotas produktas vėl ištirpintas 4 ml bevandenio TFA ir laikytas N₂ atmosferoje 0 °C temperatūroje 1,5 val., kad pasišalintų apsauginė Boc grupė. Deblokuotas mPEG-insulinas praskiestas iki 50 ml dejonizuotu vandeniu ir dializuotas prieš 0,1 % NH₄HCO₃ ir dejonizuotą vandenį per nakt. Liofilizacija duoda baltų miltelių produktą. Išeiga 117,6 mg (41,6 %, mol. masė 11311,6 pagal MALDI).

Mono-konjuguoto insulino procentinė sudėtis masės spektrų duomenimis yra maždaug 90 %, kas patvirtina šio sintezės metodo specifinį pobūdį. Papildomi charakterizuojantys duomenys pateikiami 5 pavyzdyje. Susidariusiame produkte insulino kiekis yra 51,3 %. Lengvesniam žymėjimui N^{αB1}-metoksipoli(etilenglikol)5K-propionamido-insulinas arba mPEG5K-PheB1-insulinas čia toliau bus žymimas kaip "5K PEG insulinas".

3 pavyzdys

mPEG-2K-SPA-insulino konjugato sintezė

Toliau aprašyta metodika naudota gauti insuliną, pegilintą nespecifiniu vietos atžvilgiu (t.y., atsitiktiniu) būdu, naudojant tiesios grandinės polietilenglikolį, turintį molekulinę masę maždaug 2000 Daltonų. 0,1012 g insulino (mol. masė 5826 Da, 0,01737 mmol) ištirpinta 0,5 ml bevandenio DMSO ir veikta 50 μ l trietilamino (0,3587 mmol, 20-kartinis molinis perteklius). Į aukščiau paminėtą reakcijos mišinį buvo pridėta 52 mg m-SPA-2000 (mPEG-sukcinimidilpropionato, Shearwater Corporation, mol. masė apie 2000 Da, 0,02605 mmol, 1,5 karto molinis perteklius). Mišinys maišytas apie 17 val. kambario temperatūroje azoto atmosferoje. Po to reakcijos mišinys ištirpintas 0,1 % TFA iki bendro tūrio 5,5 ml ir grynintas atvirkštinių fazių HPLC, naudojant C-18 kolonėlę ir acetonitrilą/0,1 % TFA kaip eliuentą. Atvirkštinių fazių HPLC davė abiejų produktų mišinį – mono- (prijungtas vienas PEG) ir di-pegilinto (prijungti du PEG); kompozicija čia vadinama “2K PEG insulinu.

Išėiga 68 mg. Insulino kiekis RP-HPLC duomenimis: 50,5 mg.

4 pavyzdys

mPEG-750 Da-SPA-insulino konjugato sintezė

Kompozicija, susidedanti pagrindinai iš insulino, pegilinto B1 vietoje, buvo gauta specifiniu vietos atžvilgiu būdu, naudojant tipišką polietilenglikolio modifikatorių, t.y., tiesios grandinės 750 daltonų polietilenglikolį, turintį sukcinimidilpropionatą grandinės gale, tinkantį kovalentiniam insulino surišimui.

4A. Di- N^{A1}, N^{B29} -t-Boc-insulino sintezė.

Di-apsaugotas insulinas pagamintas tokiu būdu: 602 mg žmogaus insulino (0,103 mmol) ištirpinta 3,0 ml bevandenio dimetilsulfoksido (DMSO) turinčio 166 μ l trietilamino. Į insulino tirpalą pridėta 50 μ l di-tret-butildikarbonato (0,215 mmol). Po 60 min. kambario temp., reakcijos mišinys išverstas į 240 ml acetono, po to pridėta 3 lašai 6M HCl, kad prasidėtų flokuliacija. Nuosėdos atskirtos filtruojant ir išdžiovintos vakuume. Reakcijos produktas išgrynintas preparatyvine HPLC, naudojant Waters 25x100 mm C18 kolonėlę (vid. dalelių dydis 15 μ m; porų dydis 100 Å). Eliuентаis naudoti acetonitrilo ir 0,1 % TFA

mišiniai dejonizuotame vandenyje, 3,0 ml/min. greičiu. Produktas surinktas, distiliuotas pašalinant acetonitrilą ir tada liofilizuotas. Išeiga 164,8 mg (26,7 %, mol. masė apie 6000 pagal MALDI).

4B. MPEG-750 Da-SPA-PheB1-insulino konjugato sintezė.

63,4 mg (apie 0,01056 mmol) šviežiai išgryninto di- N^{A1} , N^{B29} -t-Boc-insulino iš 4A pavyzdžio ištirpinta 0,5 ml DMSO, turinčio 200 μ l trietilamino. Į insulino tirpalą pridėta 33 mg (0,03173 mmol, mSPA750 mol. masė yra apie 1040 Da) mPEG-SPA-750 (mPEG-sukcinimidilpropionatas, mPEG-O-CH₂CH₂C(O)O-sukcinimidas, PEG mol. masė 750). Inkubuota kambario temperatūroje per naktį (29 val.), po to į reakcijos mišinį pridėta 300 μ l TFA, ir susidaręs mPEG-insulino darinys nusodintas 100 ml eterio ir išdžiovintas vakuume. Išeiga apie 28,5 mg su 21,3 mg insulinokieio pagal atvirkštinių fazių HPLC duomenis (33,6 %, mol. masė apie 6639,3 Da pagal MALDI). Paprastumo dėlei čia aprašyta kompozicija toliau vadinama "750 PEG insulinas".

Su šia medžiaga atliktos dvi skirtingos sintezės, abi naudojant aukščiau aprašytą sintezės metodiką su viena išimtim: viena sintezė vykdyta esant mPEG-SPA-750 molių santykiui su insulinu 7:1, tuo tarpu kita sintezė vykdyta, esant molių santykiui mPEG-SPA-750 su insulinu 3:1. Kompozicijos, susidariusios šių dviejų sintezių rezultate čia vadinamos kaip "750-1 PEG insulinas" (PEG reagento molinis santykis su insulinu buvo 7:1) ir "750-2 PEG-insulinas" (molinis PEG reagento santykis su insulinu buvo 3:1).

5 pavyzdys

Pavyzdinių PEG-insulino kompozicijų charakterizavimas

Aukščiau aprašytos pegilintų insulino konjugatų kompozicijos dar buvo charakterizuotos įvairiais analitiniais metodais.

Masės spektrometrija buvo panaudota, siekiant įvertinti santykių mono, di ir tri konjuguotų insulinių (taip pat vadinamų PEG insulino monomeru, dimeru ir trimeru) kieki, esantį kiekvienoje kompozicijoje, pagal santykinį smailių plotą. Rezultatai pateikiami žemiau 1 lentelėje.

1 lentelė. Santykinis mono-, di- ir tri-konjuguoto insulino kiekis pagal masės spektroskopijos duomenis

PEG-insulino kompozicija	% mono-konjugato	% di-konjugato	% tri-konjugato
5K PEG insulinas	91	4	nenustatyta
750-1 PEG insulinas	46	39	15
750-2 PEG insulinas	60	32	8
2K PEG insulinas	51	45	nenustatyta

Molekulinių sietų chromatografija (SEC) atlikta su aukščiau aprašytomis 750-1, 750-2 ir 2K PEG-insulino kompozicijomis, naudojant dvi Shodex SEC kolonėles (numeris KW-802.5), apjungtas į seriją Waters 2690HPLC sistemoje. Mobili fazė susideda iš 22 % ledinės acto rūgšties ir 33 % acetonitrilo (t/t) vandenyje. Chromatografiniai duomenys buvo naudoti kaip alternatyvus būdas įvertinti santykinį mono, di ir tri konjuguoto insulino kiekį kiekvienoje kompozicijoje. Rezultatai pateikti žemiau 2 lentelėje. Kaip matyti palyginus duomenis 1 ir 2 lentelėse, du skirtingi metodai duoda rezultatus, kurie yra artimi, vertinant santykinį mono, di ir tri konjuguoto insulino kiekį kiekvienoje kompozicijoje.

2 lentelė. Santykinis mono-, di- ir tri-konjuguoto insulino kiekis pagal HP-SEC

Insulino tipas	% mono-konjugato	% di-konjugato	% tri-konjugato	% kiti
PEG 750-1	48	47	5	0
PEG 750-2	66	26	7	2
PEG 2000	40	51	nd	9

Atlikti papildomi tyrimai, siekiant nustatyti įvairių pagal padėtį konjugatų pasiskirstymą kiekvienoje iš trijų pavyzdinių kompozicijų, t.y., pakeitimo laipsnį kiekviename iš trijų galimų prijungimo vietų, A-1Gly, B-1Phe arba B-29Lys. Disulfidinių ryšių insuline suskaidymui naudotas ditiotreitolis (DTT, Sigma), kas sąlygoja kovalentinių ryšių tarp insulino A ir B grandinių suskaidymą.

Kad įvyktų redukcijos reakcija, PEG-insulino bandiniai ištirpinti 8 M karbamido turinčio 0,4 M amonio bikarbonato, esant maždaug 0,2 mg/ml ekvivalentinio insulino masės kiekvienai konjugato rūšiai. DTT ištirpintas vandenyje (7 mg/ml), gaunant vandeninį DTT tirpalą. Tada viena DTT tirpalo dalis pridedama prie 5 dalių kiekvieno iš

insulino tirpalų, ir redukcijos reakcija vykdoma 15 minučių 50 °C temperatūroje. Redukuotos 750 PEG insulino kompozicijos alkilintos jodacetamidu (Sigma). PEG-insulino tirpalų šešios dalys reagavo su 1 dalimi 100mM jodacetamido, prieš paleidžiant į chromatografiją ir fermentiškai suskaidant. Reakcijos produktai analizuoti HPLC pagalba. Konjugavimas su A arba B grandine buvo įvertintas pagal insulino A arba B grandinę, eliuotą vėliau negu kontrolė (ir priskirtą konjugatui su polietilenglikoliu). Šių vėliau išeliuotų smailių nebuvo tikimu užlaikymo laiku kontrolės atveju. Pagal santykinį smailių plotą nustatytas procentinis polietilenglikolio konjugavimo su insulino A arba B grandine kiekis.

Toliau tiriant santykinį kiekį PEG'o, prijungto prie B-29Lys lyginant su B1-Phe, 750-1 ir 750-2PEG insulino kompozicijų redukuotos ir alkilintos A ir B grandinės, gautos aukščiau aprašytoje redukcijoje DTT, buvo toliau skaidomos sekvenavimo markės fermentu Endoproteinaze Glu-C (Sigma). Pagamintas tirpalas, turintis 0,125 µg/µl fermento vandeniniame amonio bikarbonate. Prieš pridedant fermento tirpalą, insulino koncentracija kiekviename redukcijos reakcijos mišinyje buvo 0,05 µg/µl 8 m karbamido, turinčiame 0,4 M amonio bikarbonato. Tada 1 dalis fermento tirpalo pridėta į 40 dalių insulino tirpalo. Skaidymas Endoproteinaze Glu-C fermentu duoda insulino peptidų fragmentus A1-A4, A5-A17, A18-A21, B1-B13, B14-B21 ir B22-B30.

Fragmentai, susidarę fermentu skaidant 750-1 ir 750-2 PEG-insulino kompozicijų tiek A, tiek B grandines, analizuoti HPLC pagalba, siekiant įvertinti bendrą PEG prijungimo prie insulino vietų pasiskirstymą kiekvienoje iš šių kompozicijų. Kontrolėje nesančios smailės kiekis procentais leidžia įvertinti fragmento, konjuguoto su PEG kiekį, kadangi tas fragmentas eliuojamas kitoje chromatogramos vietoje.

3A lentelė

PEG prijungimo vietų pasiskirstymas pavyzdinėse PEG-insulino kompozicijose

Insulino tipas	% konjuguotų per A1 vietą	% konjuguotų per B1 vietą	% konjuguotų per B-29 vietą
PEG 750-1	30	95	21
PEG 750-2	11	95	15
PEG 2000	63	85*	

* nėra suskaidymo duomenų, tik sumažintas išskyrimas

Skaičiai 3A lentelėje pagrįsti galimybe kiekvienoje vietoje konjuguoti 100 procentų. Pavyzdžiui, kiekvienas mono-konjugatas turi 3 galimas konfigūracijas (mono-A1, mono-B1, Mono-B29), ir kiekvienas di-konjugatas turi 3 konfigūracijas (di-A1, B1; di-A-1, B-29; ir di-B-1, B-29). Analizuojant 3A lentelės duomenis, pvz., PEG-750-1 atveju, iš visų galimų konjugatų, esančių kompozicijoje, 95 % PEG-insulino konjugatų turi polietilenglikolį, kovalentiškai prijungtą B-1 vietoje.

3B lentelė. Įvairios galimos konjugatų rūšys

Tipai	Mono-konjugatai			Di-konjugatai			Tri-konjugatai	HMWP
Rūšių #	1	2	3	4	5	6	7	8
Konjugavimo vieta	A-1	B-1	B-29	(A-1+B-1)	(A-1+B-29)	(B-1+B-29)	(A-1+B-1+B-29)	Konjuguoti insulino dimerai

6 pavyzdys

750-2 PEG insulino ir nemodifikuoto insulino fermentinio skaidymo greičių palyginimas

750-2 PEG insulino fermentinio skaidymo chimotripsinu greitis lygintas su insulino skaidymo greičiu.

Insulino kontrolė ir PEG 750-2 insulino kompozicija paruošti kaip 1 mg/ml tirpalai fosfatiniame natrio chlorido tirpale, turinčiame pH 7,8. Chimotripsinas paruoštas kaip 1 mg/ml tirpalas 1 mM HCl tirpale. Fermento tirpalo 1 dalis pridėta prie 20 dalių insulino tirpalo. Maždaug kas valandą iš mišraus tirpalo paimamos mažos alikvotos.

RP(atvirkštinių fazių)-HPLC metode naudota C-18 kolonėlė su mobiliąja faze, turinčia natrio perchlorato, fosforo rūgšties ir acetonitrilo. Pegilinto insulino rūšių eliuavimui, identifikuotų kaip grupė prastai išsiskyrusių smailių, stebimų ties 214 nm, naudotas acetonitrilo gradientas. Smailių grupė integruota į vieną ir pavadinta PEG-insulinu. Vykstant skaidymui, daromas prarasto nepažeisto PEG-insulino ir insulino grafikas (Fig. 1). Apskaičiuotas jų gyvavimo puslaikis, esant chimotripsino.

Laikas, reikalingas fermentiškai suskaidyti 750-2 PEG kompozicijos pagrindinio komponento pusę koncentracijos, buvo penkis kartus didesnis, nei nemodifikuoto insulino.

Kitaip tariant, suskaidyti chimotripsinu pusę pavyzdinio pegilinto insulino koncentracijos reikia penkis kartus ilgesnio laiko, negu normaliam insulinui. Šie rezultatai demonstruoja PEG-insulino konjugatų potencialą ilgiau išlikti alveolėse dėl didesnio atsparumo proteolitiniam skilimui, lyginant su nemodifikuotu insulinu.

7 pavyzdys

Serumo gliukozės ir insulino koncentracijų po intraveninio 5K PEG insulino įvedimo
žiurkėms įvertinimas (P-2001-015)

Šis tyrimas atliktas, siekiant nustatyti, ar insulino aktyvumas 5K PEG insulino kompozicijoje išliko, chemiškai modifikuojant pavyzdine 5K polietilenglikolio grandine, ir siekiant nustatyti dozės ir gliukozės atsako priklausomybę šias kompozicijas įvedus intraveniniu būdu.

Sprague Dawley žiurkių patinėliai, su įstatytomis kaniulėmis (jungo/hemoralinė vena [JVC/FVC]), turinčiomis priėjimo vietą, išvestą po oda į išorę prie sprando, buvo pateiktos Hiltop Lab Animals Inc (P.O. Box 183, Acottdale, PA 15683). Jungo venos kaniulės buvo užpildytos farmacinės markės polivinilpirolidono (PVP – mol. masė 40000) tirpalu (kraujagyslės spindžio užpildas), fiziologiniu tirpalu ir heparino nario druska, kad išlaikyti potenciją. Nailoninio užpildo kamštis, uždarančias kaniulę, tyrimo dieną buvo pašalintas ir pakeistas Monoject buka kaniule 23Gx1 (VWR ≠ 53498-484). Tyrimo sistema apima 1 žiurkės patinėlį, atsitiktinai parinktą iš placebo grupės, 2 žiurkių patinėlius, atsitiktinai parinktus iš ne-pegilintos grupės, ir 4 žiurkių patinėlius, atsitiktinai parinktus iš PEG-insulino grupės. Šiame tyrime pegilinto insulino šaltinis buvo 5K PEG insulinas iš 2 pavyzdžio. Dozės buvo įvedamos intraveniškai.

Gyvuliukų skaičius/Lytis

1 diena: 1 patinėlis/grupei placebo grupėje 1

2 patinėliai/grupei 2 grupėje; 4 patinėliai/grupei grupėse 3-5

Prieš pradėdant tyrimą, gyvuliukams neduodama ēsti 12-18 val. Žmogaus insulinas prieš naudojimą laikytas –20 °C temperatūroje. Įvedimui paruošti du skirtingi tirpalai:

Tirpalai intraveniniam įvedimui:

Ne-PEGilintas žmogaus insulinas (1,0 mg/ml tirpalas): 1,0 ml PBS pridedama į 1,0 mg insulino miltelių.

5K insulinas (1,0 mg/ml žmogaus insulino koncentracija, apskaičiuota pagal insuliną, o ne pagal konjugatą): 6,0 ml PBS pridedama į 11,7 mg 5K PEG insulino miltelius.

Gyvuliukai anestezuoti, duodant įkvėpti izoflurano. Intraveninė dozė (300 µl/gyvuliukui) įleistos per FVC, po to kateteris uždarytas, kad išvengtų kryžminio užteršimo imant kraują. Visi kraujo pavyzdžiai buvo imami per JVC. Fosfato buferio tirpalas (PBS) 1 grupei įvestas 300 µl i.v. doze. Ne-pegilintas žmogaus insulinas įvestas 3 grupei 20 µg/gyvuliukui i.v. doze. Pegilinto žmogaus insulino vaisto forma įvesta 2 grupei 20 µg/gyvuliukui i.v. doze, 4 grupei 40 µg/gyvuliukui i.v. doze, ir 5 grupei 30 µg/gyvuliukui i.v. doze. Kraujo mėginiai (apie 500 µl) paimti iš JVC prieš dozavimą (2-0,25 val. prieš dozavimą), ir po 10, 15, 30, 60, 120 ir 180 min. nuo dozės įvedimo. Mažas kraujo kiekis užnešamas ant gliukozės nustatymo juostelės, kad išmatuotų gliukozės kiekį kraujyje gliukozės monitoriumi Glucometer Elite (Bayer Corp., Elkart, IN). Mėginio likutis patalpinamas į centrifugą ir centrifuguodamas. Po to serumas nudekantuojamas į atskirą mėgintuvėlį ir analizuojamas radijo-imuniniu metodu. (RIA). Vidurkia ir standartinis nuokrypis (SD) apskaičiuojami naudojant Microsoft® Excel 2000 programą.

4 lentelė. *In vivo* eksperimentų apibendrinimas.

Toliau pateikiami tikrosios įvestos dozės bei tikrasis gyvuliukų skaičius kiekvienoje grupėje. Tyrimas atliktas per vieną dieną.

Grupės Nr.	Kompozicija	Įvedimo būdas	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Gyvuliukų skaičius/lytis
1	Placebas	i.v.	0	1M
2	Ne-PEG insulinas	i.v.	20	2M
3	PEG insulinas	i.v.	20	4M
4	PEG insulinas	i.v.	40	4M
5	PEG insulinas	i.v.	30	4M

Rezultatai rodo, kad 5K PEG insulino kompozicija pasižymi bioaktyvumu, t.y., modifikuojant polietilenglikoliu insulino molekulė išlieka aktyvi, kas matyti iš jos gebėjimo sumažinti gliukozės kiekį kraujyje. Vidutinės serumo insulino koncentracijos po

intraveninio pegilinto insulino įvedimo priklauso nuo dozės; taip pat stebimas nuo dozės priklausantis gliukozės kiekio mažėjimas. Rezultatai apibendrinti Fig. 2 ir Fig. 3. Fig. 2 yra vidutinių serumo insulino koncentracijų kreivė, įvedus intraveniniu būdu pegilinto ir nepegilinto insulino pavyzdines kompozicijas; Fig. 3 yra kraujo gliukozės koncentracijų kreivė, įvedus intraveniniu būdu aukščiau aprašytas kompozicijas.

8 pavyzdys

5K PEG insulino įvedimas į plaučius (P-2001-017)

Pavyzdinis pegilintas insulinas 5K PEG insulinas įvedamas žiurkėms intratrachėjiniu būdu, siekiant nustatyti (i) ar jo aktyvumas išlieka, įvedus į plaučius, ir (ii) jo įtaką, jei tokia būtų, serumo insulino ir gliukozės koncentracijoms, kai įvedama tiesiogiai į plaučius.

Pradiniai tirpalai:

Ne-pegilintas insulinas: 1 ml PBS pridedamas į 1,0 mg insulino miltelių, kad gautų 1 mg/ml pradinį tirpalą. Insulino pradinis tirpalas (kontrolė) pagaminamas tyrimų pradžios dieną.

5K PEG insulinas: 4,0 ml PBS pridedama į 7,8 mg 5K PEG insulino miltelius, gaunamas 1 mg/ml (skaičiuojant pagal insuliną) pradinis tirpalas.

Dozavimo tirpalai:

40 µg/gyvuliukui insulino: 667 µl insulino pradinio tirpalo pridedama į 4,33 ml PBS per 2 dozavimo valandas.

150 µg/gyvuliukui insulino B-1: 2,5 ml 5K PEG insulino pradinio tirpalo pridedama į 2,5 ml PBS per 2 dozavimo valandas.

Intratrachėjinis instiliavimas:

Žiurkės lengvai anestezuotos, pleksiglazo kameroje maždaug 5 minutes duodant kvėpuoti 3,0-5,0 % izoflurano (Abbott Laboratorines), sumaišyto su deguonimi. Įvedimas įvykdytas, įkišant zondo adatą (Popper & Sons Inc.; 18x3'' W2-1/4 mm balionėlis, New Hyde Park, NY 11040), sujungtą su 1 ml švirkštu, per snukutį žemyn iki trachėjos, vos aukščiau pagrindinės keteros. Įvedant zondo adatą, tikslesnė įkišimo vieta nustatoma apčiuopiant zondo balionėliu gerklės kremzlinių žiedų nelygumus po oda. Šiuo metodu dozės įvedamos į plaučius, po to zondas pašalinamas.

Šiame tyrime naudota keturiolika ($n=7/\text{grupe}$) badavusių žiurkių patinėlių (Hilltop Lab Animals, Scottsdale, PA (300-350 g)) su nuolatiniais jungo venų kateteriais (JVC). Nepegilintas žmogaus insulinas įvestas 1 grupei kaip 40 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$ i.t. dozė. Pegilinto žmogaus insulino vaisto forma buvo įvesta 2 grupei kaip 150 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$ i.t. dozė. Kraujo mėginiai (apie 500 μl) paimti prieš dozavimą (2-0,25 val. prieš dozavimą) ir po 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 ir 720 minučių po dozavimo. Mažas kraujo kiekis užnešamas ant gliukozės nustatymo juostelės, kad išmatuotų gliukozės kiekį kraujyje gliukozės monitoriumi Glucometer Elite (Bayer Corp., Elkart, IN). Mėginio likutis patalpinamas į centrifugą ir analizuojamas radijo-imuniniu metodu (RIA). Vidurkiai ir standartinis nuokrypis (SD) apskaičiuojami naudojant Microsoft® Excel 2000 programą. Gyvuliukas 2-3 iškrito iš tyrimo dėl užsikimšusio kateterio.

5 lentelė. *In vivo* eksperimentų žiurkėse apibendrinimas

Grupės Nr.	Insulino tipas	Įvedimo būdas	Gyvuliukų skaičius/lytis	Insulino bendra dienos dozė ($\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$)	Dozavimo dienų skaičius
1	Insulinas	I.T.	7M	40	1
2	5K PEG insulinas	I.T.	7M	150	1

6 lentelė. *In Vivo* dozių kiekiai

Grupės Nr.	Insulino tipas	Insulino bendra dienos dozė ($\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$)	Dozės tūris (μl)	Dozuojamo tirpalo tūris ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	Insulinas	40	300	133.33
2	5K PEG insulinas	150	300	500

Insulino ir 5K PEG insulino vidutinės serumo koncentracijos ir vidutinės kraujo koncentracijos po intratrachėjinio įvedimo pavaizduotos Fig. 4 ir Fig. 5, atitinkamai. Rezultatai rodo, kad išradimo pegilinto insulino kompozicijos pasižymi aktyvumu įvedant į plaučius ir esant plaučiuose. Farmakokinetiniai duomenys dar rodo, kad pegilintas insulinas ne tik praeina per plaučius į kraujo apytaką, bet tuo metu išlaiko savo aktyvumą, ką rodo nustatyti serumo insulino kiekiai, atitinkantys ne endogeninį insuliną. Pagal stebimą maždaug 1 val. bėgyje po intratrachėjinio įvedimo insulino kiekį kraujyje atrodo, kad pegilintas insulinas iš esmės neužsilaiko plaučiuose ir greitai pereina į kraujo apytaką netrukus po įvedimo. Rezultatai dar parodo, kad, įvestas į plaučius, pegilintas insulinas

efektyviai sumažina gliukozės kiekį kraujyje. Tačiau šiame pavyzdyje pegilintas insulinas pasirodo mažiau efektyvus negu ne pegilintas insulinas dozėmis, įvedamomis gliukozės kiekio mažinimui. Tiek farmakokinetinės, tiek farmakodinaminės atsako į intratrachėjiniu būdu įvestą pegilintą insuliną kreivės kažkiek primena nepegilintą insuliną, nors, sprendžiant pagal Fig. 4 kreives, PEG-insulinas atrodo yra ilgiau veikiantis, negu nepegilintas insulinas. Tolesnį konkretaus chemiškai modifikuoto insulino produkto dozuojamų kiekių ir konkrečių polietilenglikolio modifikatorių optimizavimą gali nesunkiai įgyvendinti šios srities specialistas, vadovaudamasis čia pateikiamais nurodymais ir priklausomai nuo dozavimo reikalavimų, pasirenkamų pacientų, gydomos būklės ir pan.

9 pavyzdys

750-1 PEG insulino įvedimas į plaučius

(P-2001-025)

Pavyzdinis pegilintas insulinas 750-1-PEG insulinas įvestas žiurkėms intratrachėjiniu būdu. Iš dalies tyrimas įvykdytas siekiant ištirti insulino, kovalentiškai surišto su viena ar daugiau polietilenglikolio grandinių, turinčių apytikslių molekulinę masę 1000 Daltonų ar mažiau, kompozicijos, įvestos į plaučius, poveikį.

Žiurkių *in vivo* tyrimas atliktas iš esmės taip, kaip aprašyta 8 pavyzdyje aukščiau. Tikslus dozavimo režimas ir įvestos dozės apibendrinamos lentelėse žemiau.

7 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Įvedimo būdas	Gyvuliukų skaičius/lytis	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Dozavimo dienų skaičius
1	Insulinas	i.t.	2M	80	1
2	750-1 PEG insulinas	i.t.	4M	100	1
3	750-1 PEG insulinas	i.t.	4M	300	1
4	750-1 PEG insulinas	i.t.	4M	500	1

8 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Insulino bendra dienos dozė (μg/gyvuliukui)	Dozės tūris (μl)	Dozuojamo tirpalo koncentracija (μg/ml)
1	Insulinas	80	300	266.67
2	750-1 PEG insulinas	100	300	333.33
3	750-1 PEG insulinas	300	300	1000.00
4	750-1 PEG insulinas	500	300	1666.67

Serumo insulino ir kraujo gliukozės koncentracijų, įvedus žiurkėms insuliną ir 750-1-PEG insuliną intratrachėjiniu būdu, grafikai pavaizduoti Fig. 6 ir Fig. 7, atitinkamai. Iš vidutinių serumo insulino koncentracijų kreivės Fig. 6 matyti, kad natyvus arba nepegilintas insulinas pasiekia savo maksimalią koncentraciją serume po maždaug 15 min., tuo tarpu pegilinto insulino kompozicijos pasiekia maksimalią serumo koncentraciją po 6 val. (100 μg/gyvuliukui) ir po 8 val. (300 μg/gyvuliukui), kas rodo šių kompozicijų, įvestų į plaučius inhaliuojant, ilgalaikio veikimo pobūdį. Kaip rodo Fig. 6, nemodifikuotas insulinas grįžta į foninį lygį po 6 val. nuo įvedimo, tuo tarpu pegilinto insulino kiekis po 6 val. buvo žymiai didesnis už foninį lygį (maždaug 3-7 kartus ar daugiau didesnis už foninį lygį). Be to, pegilinto insulino intratrachėjinis įvedimas duoda užlaikytą sisteminį insulino kiekį, kuris negrįžta iki foninio lygio netgi po 12 val. nuo įvedimo. Faktiškai, pegilinto insulino atveju insulino kiekis buvo daugiau nei 3 kartus didesnis už foninį kiekį (t.y., už nemodifikuoto insulino kiekį) tiek po 8, tiek po 12 val. Šių rezultatų kreivės pateiktos Fig. 6.

Apibendrinant, 750-1-PEG insulinas, įvedus į plaučius, duoda didesnį sisteminį insulino kiekį, lyginant su nemodifikuotu insulinu. Be to, sisteminio kiekis pegilinto insulino atveju yra žymiai virš foninio kiekio netgi po 12 val. Kitaip tariant, padidinti insulino kiekiai pegilinto insulino atveju išlieka mažiausiai dukart ilgiau, negu nemodifikuoto insulino. Šie duomenys dar parodo, kad pegilintas insulinas pereina plaučius, yra bioaktyvus ir ilgiau užtikrina sisteminį insulino kiekį, lyginant su nemodifikuotu insulinu.

Vidutinių gliukozės koncentracijų kraujyje po intratrachėjinio nepegilinto insulino įvedimo, lyginant su 750-1- pegilintu insulinu, kreivės pateiktos Fig. 7. Pegilinto insulino

atveju kraujo gliukozės atsako kiekiai gerai koreliuoja su serumo insulino kiekiais. (Kitaip tariant, padidėjus serumo insulino kiekiui, taip pat stebimas atitinkamas kraujo gliukozės kiekio sureguliojimas/sumažėjimas). Iš Fig. 7 matyti, kad šio išradimo pegilinto insulino kompozicijos, įvestos peroraliai į plaučius, demonstruoja greitą veikimo pradžią, lyginant su natyviu insulinu, o ne uždelstą veikimo pradžią, būdingą daugeliui uždelsto veikimo vaisto formų. Kitaip tariant, gliukozės kiekio sureguliojimas pasireiškia greitai po įvedimo. Be to, tuo tarpu kai natyvus arba ne pegilintas insulinas pasiekia maksimalų gliukozės kiekio sumažinimą po maždaug 2 val., gliukozės kiekio maksimalaus sumažėjimo laikas pegilinto insulino atveju išsiplečia iki mažiausiai 4 val., 6 val. ir 8 val. 500 µg, 100 µg ir 300 µg dozių atveju, atitinkamai. Taigi, laikas maksimaliam gliukozės kiekio sumažėjimui pasiekti pegilinto insulino, įvesto į plaučius, atveju pailgėja 2-4 kartus, lyginant su nepegilintu insulinu. Aplačiai, gliukozės kiekio sureguliojimas 750-1-PEG insulinu, buvo žymiai padidėję 12 val. bėgyje, lyginant su nemodifikuotu insulinu. Po 8 val. nemodifikuoto insulino atveju gliukozės kiekiai iš esmės grįžo į būdingus nemodifikuotam insulinui, tuo tarpu PEG insulino atveju gliukozės kiekiai buvo 1,3-3 kartus žemesni, nei nemodifikuoto insulino atveju. Pegilinto insulino atveju gliukozės kiekis negrįžo į foninį netgi po 12 valandų, dar kartą parodydami šio išradimo chemiškai modifikuoto insulino kompozicijų prailgintą veikimą, reguliuojant gliukozės kiekį.

10 pavyzdys

750-1 Peg insulino įvedimas į plaučius (P-2002-001)

Tyrime, panašiam į aprašytą 9 pavyzdyje aukščiau, 750-1 PEG insulinas įvedamas žiurkėms intratrachėjinio būdu dozėmis, žemesnėmis nei naudotos 9 pavyzdyje.

In vivo intratrachėjinis žiurkių tyrimas vykdytas iš esmės taip kaip aprašyta 8 pavyzdyje, Tikslūs dozavimo režimai ir įvestos dozės apibendrintos lentelėse žemiau.

9 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Įvedimo būdas	Gyvuliukų skaičius/lytis	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Dozavimo dienų skaičius
1	Insulinas	i.t.	5M	80	1
2	750-1 PEG insulinas	i.t.	5M	80	1
3	750-1 PEG insulinas	i.t.	5M	160	1

10 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Dozės tūris (µl)	Dozuojamo tirpalo koncentracija (µg/ml)
1	Insulinas	80	300	266.7
2	750PEG insulinas-1	80	300	266.7
3	750PEG insulinas-1	160	300	533.3

Serumo insulino ir kraujo gliukozės koncentracijų po nemodifikuoto insulino ir 750-1-PEG insulino intratrachėjinio įvedimo žiurkėms kreivės pavaizduotos Fig. 8 ir Fig. 9, atitinkamai. Iš vidutinių serumo insulino koncentracijų kreivių Fig. 8 matyti, kad natyvus arba nepegilintas insulinas pasiekia maksimalią koncentraciją serume po maždaug 15 minučių, tuo tarpu pegilinto insulino kompozicijos pasiekia maksimalią koncentraciją serume po 2 val (80 µg/gyvuliukui) ir po 6 val. (160 µg/gyvuliukui). Kitaip tariant, laikas, reikalingas pasiekti maksimalų insulino serume kiekį PEG-modifikuoto insulino atveju išsiplėtė 8-24 kartus, lyginant su natyviu arba nepegilintu insulinu, įvedus į sisteminę kraujo apytaką per plaučius. Kaip matyti iš Fig. 8, nemodifikuoto insulino reikšmės grįžta prie bazinių po maždaug 12 valandų nuo įvedimo. Tuo tarpu insulino kiekiai PEG-insulinų atveju svyravo 2,5-3,5 kartų nuo bazinės reikšmės per tą patį 12 val. laiką. Insulino kiekiai pegilintų insulinių atveju negrįžo prie bazinių reikšmių iki maždaug 25 val, kas reiškia, kad pegilintam insulinui reikia dukart ilgesnio laiko grįžti prie bazinių reikšmių, lyginant su nemodifikuotu insulinu. Sisteminio insulino kiekis pegilintų insulinių atveju buvo užlaikytas dukart ilgesniam laikui tarpui (25 val. plg. su 12 val.), lyginant su nemodifikuotu insulinu. Laiko momentu iki maždaug 6 val. dviejose pegilinto insulino grupėse kiekiai

labai priklausė nuo įvedamos dozės (kitais tariant, insulino koncentracijos 160 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$ grupėje buvo apie dukart didesnės negu 8 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$ grupėje.

Vidutinių gliukozės koncentracijų kraujyje po intratrachėjinio nepegilinto insulino lyginant su 75-1-pegilintu insulinu įvedimo kreivės pateiktos Fig. 9. Po 25 val. nuo įvedimo, gliukozės kiekio sumažėjimas abiemis pegilintų insulinų grupėms dar nebuvo grįžęs į foninę reikšmę, priešingai nei nemodifikuoto insulino atveju. Panašiai kaip 9 pavyzdžio rezultatai, visos pegilinto insulino kreivės rodo ilgesnį gliukozės kiekio sumažėjimą, trunkantį virš 25 val. Nemodifikuoto insulino atveju po 8 val. gliukozės kiekiai beveik grįžo iki normalių, tuo tarpu PEG insulino grupėse gliukozės kiekiai buvo maždaug 1,5 karto mažesni nei nemodifikuoto insulino atveju. Šie rezultatai dar parodo, jog insulino modifikavimas viena arba daugiau polietilenglikolio fragmentų duoda gerą bioprieinamumą per plaučius ir ilgesnį sisteminį insulino lygį, taip pat ilgesnį gliukozės kiekio sumažėjimą.

11 pavyzdys

750-2 PEG insulino įvedimas į plaučius

(P-2002-003)

Pavyzdinė pegilinto insulino kompozicija 750-2-PEG insulinas, įvedama žiurkėms intratrachėjinio būdu. Šis tyrimas atliktas, siekiant toliau ištirti pegilinto ir nepegilinto insulino įvairių dozių, įvestų tiesiai į plaučius, veikimą. Tiek pegilinto, tiek nepegilinto insulino atveju gyvuliukai gavo 80 $\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$ dozę. *In vivo* žiurkių tyrimas vykdytas iš esmės taip kaip aprašyta 8 pavyzdyje, Tikslūs dozavimo režimai ir įvestos dozės apibendrintos lentelėse žemiau.

11 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Įvedimo būdas	Gyvuliukų skaičius/lytis	Insulino bendra dienos dozė ($\mu\text{g}/\text{gyvuliukui}$)	Dozavimo dienų skaičius
1	Insulinas	IT	7M	80	1
2	750PEG-2 insulinas	IT	7M	80	1

12 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Dozės tūris (µl)	Dozuojamo tirpalo koncentracija (µg/ml)
1	Insulinas	80	300	266.7
2	750PEG-2 insulinas	80	300	266.7

13 lentelė. Vidutinė insulino farmakokinetika serume

Pavyzdys	Insulino tipas	Įvedimo būdas	Dozė µg/gyvuliukui	C _{max} µU/ml	T _{Max} min	AUC µU*min/ml	Absoliutus BA
9 (P-2001-25)	Insulinas	IT	80	56	15	12878	
9	750-1 PEG	IT	100	64	368	27954	
9	750-1 PEG	IT	300	160	188	50691	
9	750-1 PEG	IT	500	3474	184	255881	
10 (P-2002-001)	Insulinas	IT	80	132	15	28167	
10	750-1 PEG	IT	80	56	210	36818	
10	750-1 PEG	IT	160	117	78	60713	
IV Ref. P-2002-002	Insulinas	IV	20	3057	5	44388	
IV Ref.	750-2 PEG	IV	20	2638	7	63190	
IV Ref.	750-2 PEG	IV	30	3510	5	62746	
11 (P-2002-003)	Insulinas	IT	80	89	24	22203	12.5
11	750-2 PEG	IT	80	164	73	57639	32** 32***

* išsiskiriantis duomuo nepašalintas iš duomenų komplekto

** i.v. 20 µg/gyvuliukui dozės atžvilgiu. Pašalinto išsiskiriančio dydžio reikšmė buvo 22 %

*** i.v. 30 µg/gyvuliukui dozės atžvilgiu. Pašalinto išsiskiriančio dydžio reikšmė nepakitusi.

Absoliutus bioprieinamumas apskaičiuotas pagal formulę:

$(AUC) (Dozė \text{ i.v. ins.}) / (AUC \text{ i.v. ins.}) (dozė)$

12 pavyzdys
2K PEG insulino įvedimas į plaučius
(P-2002-010)

Dar viena pavyzdinė pegilinto insulino kompozicija, 2K PEG insulinas, įvesta žiurkėms intratrachėjiniu būdu. Šiame tyrime naudotas 2K PEG insulinas pagamintas kaip aprašyta 3 pavyzdyje. Nepegilinto insulino atveju gyvuliukams duodama 80 µg/gyvuliukui dozė. 2K PEG insulino atveju gyvuliukams duodama 300 µg/gyvuliukui, 600 µg/gyvuliukui, 900 µg/gyvuliukui, 1200 µg/gyvuliukui dozė. *In vivo* žiurkių tyrimas vykdytas iš esmės taip kaip aprašyta 8 pavyzdyje, Tikslūs dozavimo režimai ir įvestos dozės apibendrintos lentelėse žemiau.

14 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Įvedimo būdas	Gyvuliukų skaičius/lytis	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Dozavimo dienų skaičius
1	Insulinas	i.t.	3	80	1
2	PEG2K-1 insulinas	i.t.	3	600	1
3	PEG2K-1 insulinas	i.t.	3	80	1
4	PEG2K-1 insulinas	i.t.	3	160	1
5	PEG2K-1 insulinas	i.t.	3	300	1
6	PEG2K-1 insulinas	i.t.	3	900	1
7	PEG2K-1 insulinas	i.t.	3	1200	1

15 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Dozės tūris (µl)	Dozuojamo tirpalo koncentracija (mg/ml)
1	Insulinas	80	300	0.267
2	PEG2K-1 insulinas	600	300	2.0
3	PEG2K-1 insulinas	80	300	0.267
4	PEG2K-1 insulinas	160	300	0.533
5	PEG2K-1 insulinas	300	300	1.0
6	PEG2K-1 insulinas	900	300	3.0
7	PEG2K-1 insulinas	1200	300	4.0

Vidutinių gliukozės koncentracijų kraujyje po intratrachėjinio įvedimo kreivė parodyta Fig. 12. Pegilinto insulino atveju stebimas geras atsakas į dozę, pegilinto insulino kompozicijas įvedus į plaučius (t.y., didesnės 2K PEG insulino dozės duoda didesnę kraujo gliukozės koncentracijos sumažėjimą). Nors laikas kreivėje, prie kurio pasiekiamas maksimalus gliukozės kiekio sumažėjimas, tiek pegilinto, tiek nepegilinto insulino kompozicijoms yra apie 3 val., kreivių pobūdis smarkiai skiriasi gliukozės kiekio sumažėjimo trukmės atžvilgiu. Konkrečiai, laike po maždaug 6 val. trijų didesnių 2K pegilinto insulino dozių atveju (600, 900, 1200 µg/gyvuliukui), gliukozės kiekis sumažėjęs žymiai daugiau nei nepegilinto insulino atveju. Šie rezultatai dar kartą parodo, kad įvedant pegilintą insuliną į plaučius, galima pasiekti ilgesnį sisteminį poveikį.

13 pavyzdys

Serumo gliukozės ir insulino koncentracijų po 2K PEG insulino intraveninio įvedimo

žiurkėms įvertinimas

(P-2002-009)

Šis tyrimas atliktas, siekiant toliau ištirti insulino pavyzdinėje 2K PEG insulino kompozicijoje aktyvumą, ir nustatyti intraveninės (i.v.) pegilinto žmogaus insulino (PEG2K-1) dozės dydį, kuri būtų efektyvi mažinant kraujo gliukozės koncentraciją iki maždaug 30-40 mg/dl.

Įgyvendintas panašus į aprašytą 7 pavyzdyje tyrimo protokolas, naudojant kompozicijas, gyvuliukų grupes ir dozes, apibendrintas lentelėse žemiau.

16 lentelė.

Grupės Nr.	Insulino tipas	Įvedimo būdas	Gyvuliukų skaičius/lytis	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Dozavimo dienų skaičius
1	Insulinas	i.v.	2M	20	1
2	PEG2K-1 insulinas	i.v.	2M	20	1
3	PEG2K-1 insulinas	i.v.	2M	30	1
4	PEG2K-1 insulinas	i.v.	2M	40	1
5	PEG2K-1 insulinas	i.v.	2M	80	1
6	PEG2K-1 insulinas	i.v.	2M	160	1

17 lentelė.

Grupės Nr.	Kontrolės/bandymo medžiaga	Insulino bendra dienos dozė (µg/gyvuliukui)	Dozės tūris (µl)	Dozuojamo tirpalo koncentracija (µg/ml)
1	Insulinas	20	300	67
2	PEG2K-1 insulinas	20	300	67
3	PEG2K-1 insulinas	30	300	100
4	PEG2K-1 insulinas	40	300	133
5	PEG2K-1 insulinas	80	300	267
6	PEG2K-1 insulinas	160	300	533

Vidutinių serumo insulino koncentracijų po intraveninio nepegilinto ir 2K PEG insulino įvedimo 20 µg/gyvuliukui (nepegilintas insulinas) ir 20, 30 ir 40 µg/gyvuliukui (2K PEG insulinas) dozėmis kreivės parodytos Fig. 13. Vidutinių serumo gliukozės koncentracijų po intraveninio nepegilinto ir 2K PEG insulino įvedimo aukščiau aprašytomis dozėmis kreivės parodytos Fig. 14.

Išradimo apibrėžtis

1. Insulino kompozicija įvedimui į plaučius, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta kompozicija apima insulino konjugatą, kovalentiškai surištą su viena ar daugiau negamtinio hidrofilinio polimero molekulių.

2. Insulino kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtame konjugate nėra lipofilinio fragmento.

3. Insulino kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas negamtinis hidrofilinis fragmentas yra polialkilenglikolis.

4. Insulino kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas negamtinis hidrofilinis fragmentas yra polietilenglikolis.

5. Insulino kompozicija pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas negamtinis hidrofilinis fragmentas yra polietilenglikolis.

6. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pasižymi absoliutiniu biopriemumu, kuris yra didesnis nei natyvaus insulino.

7. Kompozicija pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pasižymi absoliutiniu biopriemumu, kuris yra mažiausiai dukart didesnis nei natyvaus insulino.

8. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pasižymi absoliutiniu biopriemumu didesniu nei 15 %.

9. Kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad pasižymi absoliutiniu biopriemumu didesniu nei 30 %.

10. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad įvedus į plaučius, charakterizuojama T_{max} , kuris yra mažiausiai tris kartus didesnis nei natyvaus insulino.

11. Kompozicija pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad įvedus į plaučius, charakterizuojama T_{max} , kuris yra mažiausiai penkis kartus didesnis nei natyvaus insulino.

12. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis yra pakeistas gale.

13. Kompozicija pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis yra pakeistas gale alkoholi grupei.

14. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis yra parinktas iš grupės, susidedančios iš tiesios grandinės

polietilenglikolio, šakotos grandinės polietilenglikolio, dvišakės grandinės polietilenglikolio ir hantelių formos grandinės polietilenglikolio.

15. Kompozicija pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi biodegraduojamą tiltelį.

16. Kompozicija pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi tam tikrą skaičių (OCH_2CH_2) subvienetų, parinktų iš grupės, susidedančios nuo maždaug 2 iki 300 subvienetų, nuo maždaug 4 iki 200 subvienetų ir nuo maždaug 10 iki 100 subvienetų.

17. Kompozicija pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi nominalią vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 200 iki maždaug 10000 daltonų.

18. Kompozicija pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad polietilenglikolis yra tiesios grandinės.

19. Kompozicija pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi nominalią vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 200 iki maždaug 5000 daltonų.

20. Kompozicija pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi nominalią vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 200 iki maždaug 2000 daltonų.

21. Kompozicija pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi nominalią vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 200 iki maždaug 1000 daltonų.

22. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas insulinas yra natyvus insulinas.

23. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėto konjugato grynumas yra didesnis nei 90 %.

24. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas insulinas yra kovalentiškai per vieną ar daugiau savo amino grupių surištas su polietilenglikoliu.

25. Kompozicija pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mažiausiai 75 % B-1Phe vietų insuline yra kovalentiškai surištos su polietilenglikoliu.

26. Kompozicija pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad mažiausiai 90 % B-1Phe vietų insuline yra kovalentiškai surištos su polietilenglikoliu.

27. Kompozicija pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima insulino konjugatų monomerą ir chimera.

28. Kompozicija pagal 27 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad dar apima trimerinį insulino konjugatą.

29. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas insulinas yra kovalentiškai surištas su polietilenglikoliu per rišantįjį fragmentą, esantį minėto polietilenglikolio grandinės gale.

30. Kompozicija pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas polietilenglikolis, prieš surišant jį su insulinu, turi aktyvuotą rišantįjį fragmentą viename grandinės gale, tinkamą kovalentiniam surišimui su insulinu.

31. Kompozicija pagal 30 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas aktyvuotas rišantysis fragmentas yra tinkamas surišimui su reaktyvia insulino amino grupe.

32. Kompozicija pagal 31 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas aktyvuotas rišantysis fragmentas apima reaktyvią funkcinę grupę, parinktą iš grupės, susidedančios iš N-hidroksisukcinamido aktyvių esterių, aktyvių karbonatų, aldehydų ir acetalių.

33. Kompozicija pagal 29 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad insulinas yra kovalentiškai surištas su polietilenglikoliu amidine jungtimi.

34. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra aerofiliniame pavidale.

35. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra skystame arba sausame pavidale.

36. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji dar apima farmacinį požiūriu priimtina užpildą.

37. Kompozicija pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra purškiant išdžiovintame pavidale.

38. Insulino įvedimo, kai to reikia, žinduoliui būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima:

insulino kompozicijos pagal 4 punktą aerofilinimą ir

minėtos aerofilinės insulino kompozicijos įvedimą inhaliuojant, kad būtų užnešta ant minėto žinduolio plaučių ir absorbuota iš plaučių.

39. Iš esmės neimunogeninės insulino kompozicijos, skirtos įvedimui į subjekto plaučius, kuriam to reikia, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima:

insulino kovalentinį surišimą su negamtinio hidrofilinio polimero viena arba daugiau molekulių, kad gautų insulino-hidrofilinio polimero konjugatą, ir

minėtos kompozicijos įvedimą į subjekto plaučius, kuriam to reikia, inhaliuojant, kur minėto įvedimo rezultate minėtas insulinas pereina per plaučius ir patenka į kraujo apytaką.

40. Būdas pagal 39 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėtas negamtinis hidrofilinis polimeras yra polietilenglikolis.

41. Ilgesnio veikimo insulino kompozicijos, skirtos įvedimui į subjekto plaučius, kuriam to reikia, gavimo būdas, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad jis apima:

insulino kovalentinį surišimą su negamtinio hidrofilinio polimero viena arba daugiau molekulių, kad gautų insulino-hidrofilinio polimero konjugatą,

minėtos kompozicijos įvedimą į subjekto plaučius, kuriam to reikia, inhaliuojant, kur minėto įvedimo rezultate (i) minėtas insulinas pereina per plaučius ir patenka į kraujo apytaką, ir (ii) padidinti insulino kiekiai kraujyje išlieka mažiausiai 8 valandas po įvedimo.

42. Būdas pagal 41 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėtas negamtinis hidrofilinis polimeras yra polialkilenglikolis.

43. Būdas pagal 42 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėtas negamtinis hidrofilinis polimeras yra polietilenglikolis.

44. Būdas pagal 43 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad padidinti insulino kiekiai kraujyje išlieka mažiausiai 10 valandų po įvedimo.

45. Būdas pagal 43 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad padidinti insulino kiekiai kraujyje išlieka mažiausiai 12 valandų po įvedimo.

46. Būdas pagal 43 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad, kaip minėto įvedimo rezultatas, dar minėtame subjekte gliukozės kiekis išlieka sureguliuotas mažiausiai 10 valandų po įvedimo.

47. Būdas pagal 46 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad, kaip minėto įvedimo rezultatas, dar minėtame subjekte gliukozės kiekis išlieka sureguliuotas mažiausiai 12 valandų po įvedimo.

48. Būdas pagal 43 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėta įvedimo stadija apima įvedimą minėtos kompozicijos aerosoliniame pavidale.

49. Būdas pagal 43 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad dar apima minėtos kompozicijos aerosolinimo stadiją prieš įvedimą.

50. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta surišimo stadija apima kovalentinį insulino surišimą su polietilenglikoliu, orientuotu į specifinę surišimo vietą būdu.

51. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta surišimo stadija apima kovalentinį insulino surišimą su polietilenglikoliu atsitiktiniu būdu.

52. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas konjugatas, įvedus jį į plaučius, dar charakterizuojamas absoliutiniu bioprieinamumu, kuris yra didesnis nei natyvaus insulino.

53. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta surišimo stadija apima kovalentinį insulino surišimą su viena ar daugiau polietilenglikolio, pakeisto gale, molekulių.

54. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta surišimo stadija apima kovalentinį insulino surišimą su viena ar daugiau molekulių polietilenglikolio, parinkto iš grupės, susidedančios iš tiesios grandinės polietilenglikolio, šakotos grandinės polietilenglikolio, dvišakės grandinės polietilenglikolio ir hantelių formos grandinės polietilenglikolio.

55. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas konjugatas neturi lipofilinio fragmento.

56. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta kompozicija neturi lipofilinio fragmento.

57. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta surišimo stadija apima kovalentinį insulino surišimą su viena ar daugiau molekulių polietilenglikolio, apimančio biosuskaidomą tiltelį.

58. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi tam tikrą skaičių (OCH_2CH_2) subvienetų, parinktų iš grupės, susidedančios nuo maždaug 2 iki 300 subvienetų, nuo maždaug 4 iki 200 subvienetų ir nuo maždaug 10 iki 100 subvienetų.

59. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi nominalią vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 200 iki maždaug 10000 daltonų.

60. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi nominalią vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 200 iki maždaug 5000 daltonų.

61. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi nominalią vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 200 iki maždaug 2000 daltonų.

62. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi nominalią vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 200 iki maždaug 1000 daltonų.

63. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas surišimas apima polietilenglikolio surišimą su insulinu per jo vieną ar daugiau reaktyvių amino grupių.

64. Būdas pagal 63 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas polietilenglikolis surišamas su insulinu per jo vieną ar daugiau reaktyvių amino grupių jungtimi, parinkta iš grupės, susidedančios iš amido, uretano ir metilenamino.

65. Būdas pagal 63 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas surišimas apima polietilenglikolio, turinčio reaktyvią galinę grupę, parinktą iš grupės, susidedančios iš N-hidroksisukcinamido aktyvių esterių, aktyvių karbonatų, aldehydų ir acetalių, reakciją su viena ar daugiau reaktyvių insulino amino grupių.

66. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas surišimas duoda kompoziciją, kurioje mažiausiai apie 75 % B-1Phe vietų insuline yra kovalentiškai surištos su polietilenglikoliu.

67. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas surišimas duoda kompoziciją, kurioje mažiausiai apie 90 % B-1Phe vietų insuline yra kovalentiškai surištos su polietilenglikoliu.

68. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas surišimas duoda kompoziciją, apimančią insulino konjugatų monomero ir dimero mišinį.

69. Būdas pagal 68 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas surišimas duoda kompoziciją, dar apimančią insulino konjugato trimera.

70. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas polietilenglikolis turi aktyvuotą rišantįjį fragmentą viename grandinės gale, tinkamą kovalentiniam surišimui su insulinu.

71. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas aktyvuotas rišantysis fragmentas apima reaktyvią funkcinę grupę, parinktą iš grupės, susidedančios iš N-hidroksisukcinamido aktyvių esterių, aktyvių karbonatų, aldehydų ir acetalių.

72. Būdas pagal 70 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas aktyvuotas rišantysis fragmentas yra nuo maždaug 2 iki maždaug 20 atomų ilgumo.

73. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta įvedimo stadija apima minėtos kompozicijos įvedimą sausų miltelių inhaliatoriumi.

74. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta įvedimo stadija apima minėtos kompozicijos įvedimą graduotu doziniu inhaliatoriumi.

75. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta įvedimo stadija apima minėtos kompozicijos įvedimą purškikliu.

76. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta kompozicija dar apima farmaciniu požiūriu priimtina užpildą.

77. Būdas pagal 43 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad, minėto konjugato kompozicijos įvedimo pasėkoje per 1 valandą nuo įvedimo pasiekiamas insulino serume kiekis, mažiausiai 2 kartus didesnis už bazinį.

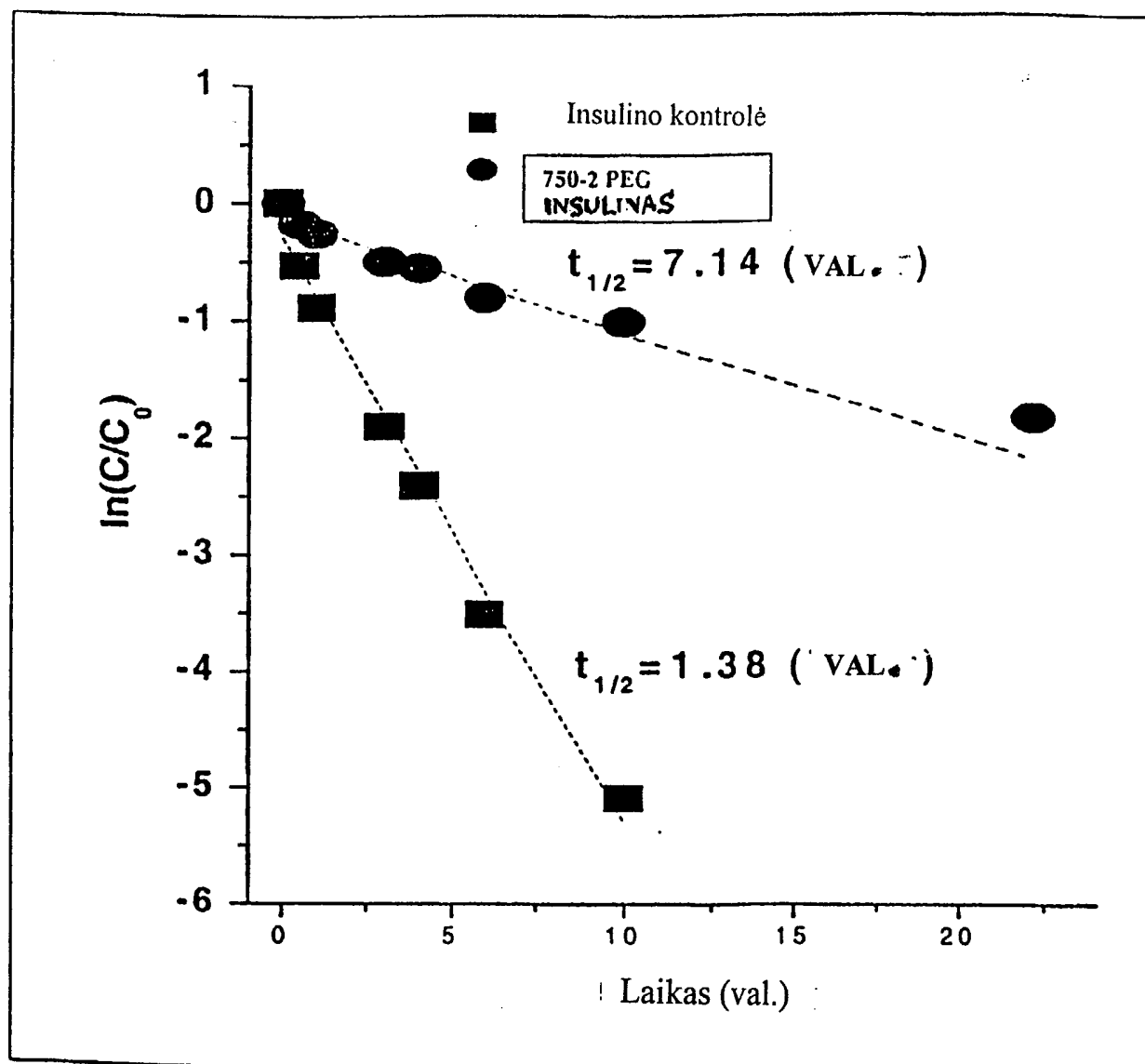


FIG. 1 750-2 PEG insulino fermentinio skaidymo greitis, lyginant su nemodifikuotu insulinu

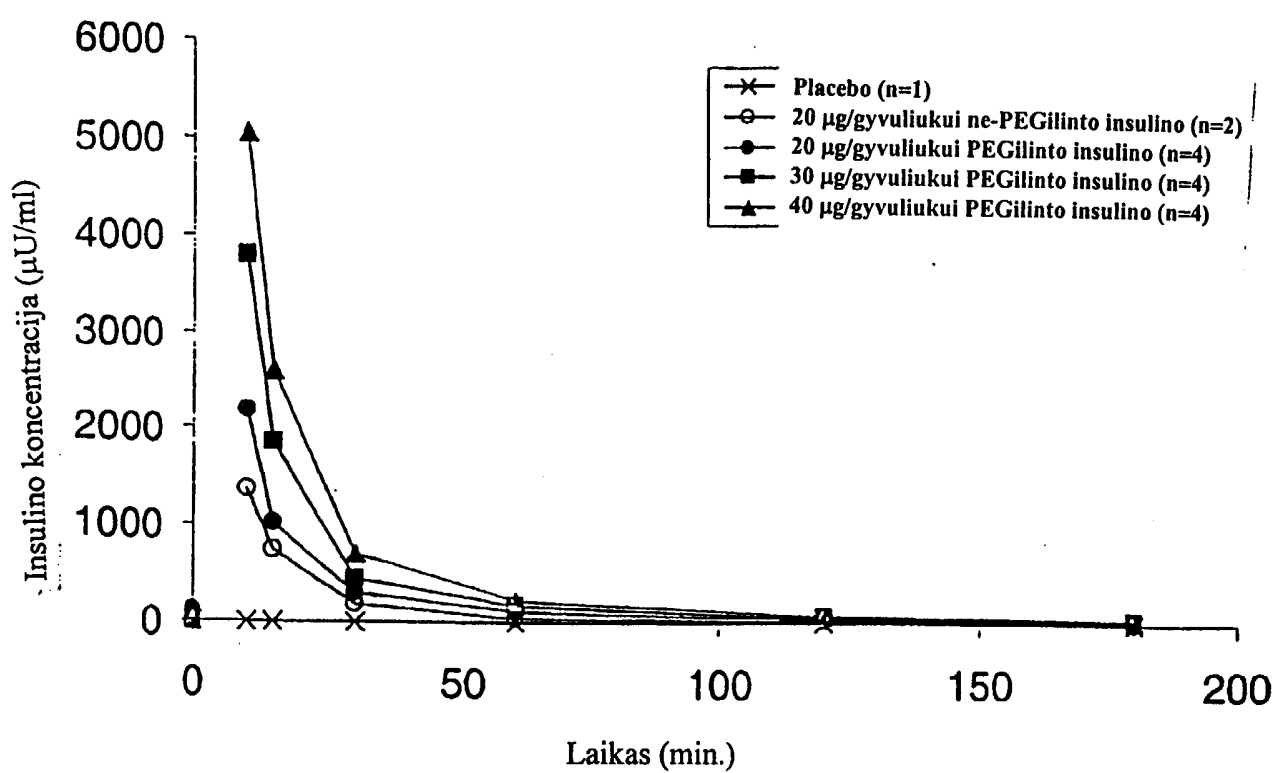


FIG. 2 5K insulino i.v. įvedimas žiurkėms:serumo rodiklių kreivės

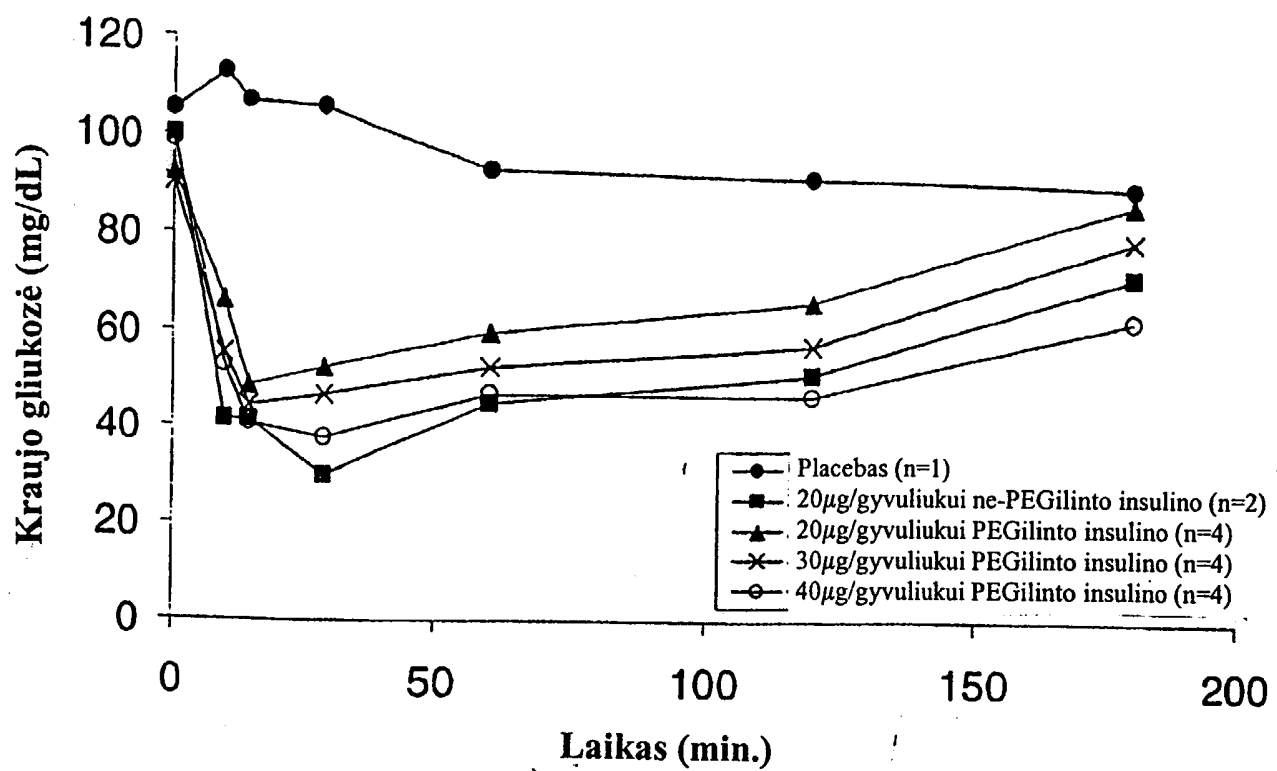


FIG. 3 5K PEG insulino i.v. įvedimas žiurkėms: vidutinės gliukozės koncentracijos kraujyje

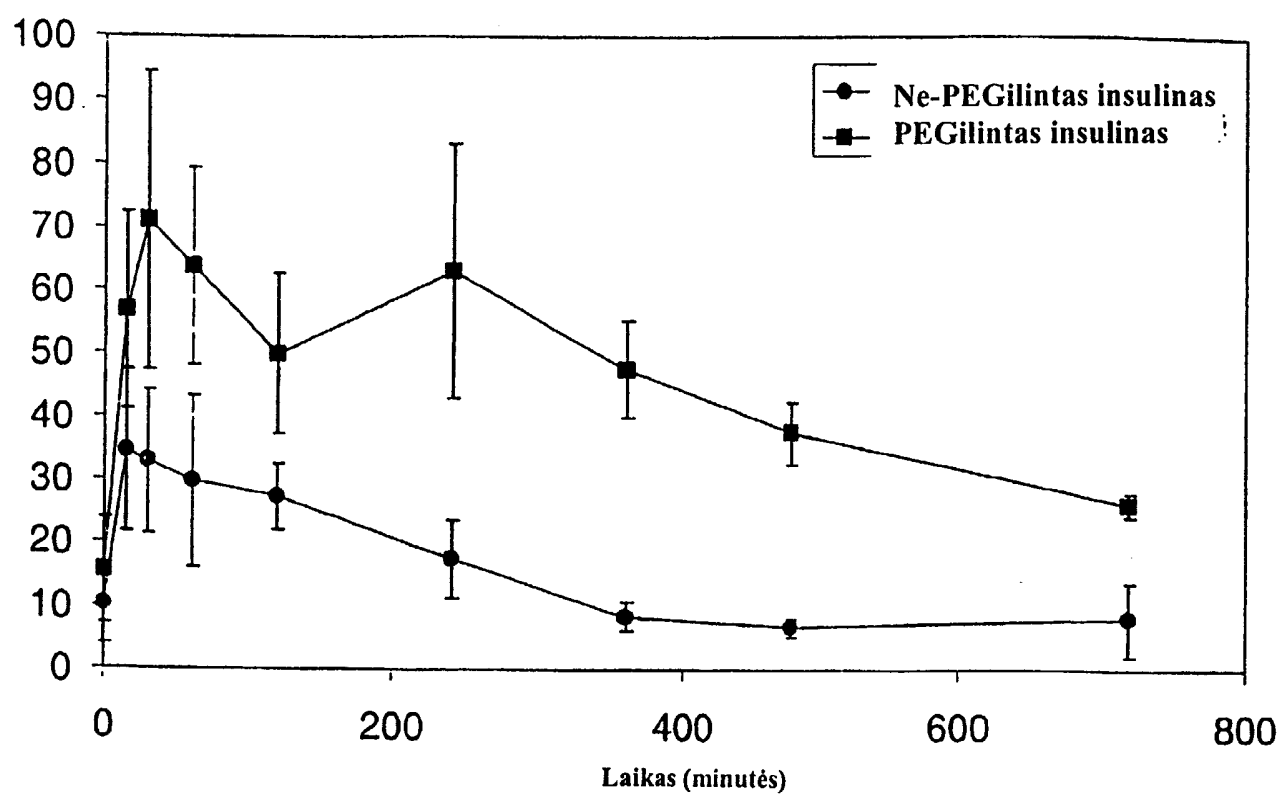


FIG. 4. 5K PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms. Išlikimo serume kreivės

(● = 40 μ g/gyvuliukui; ■ = 150 μ g/gyvuliukui)

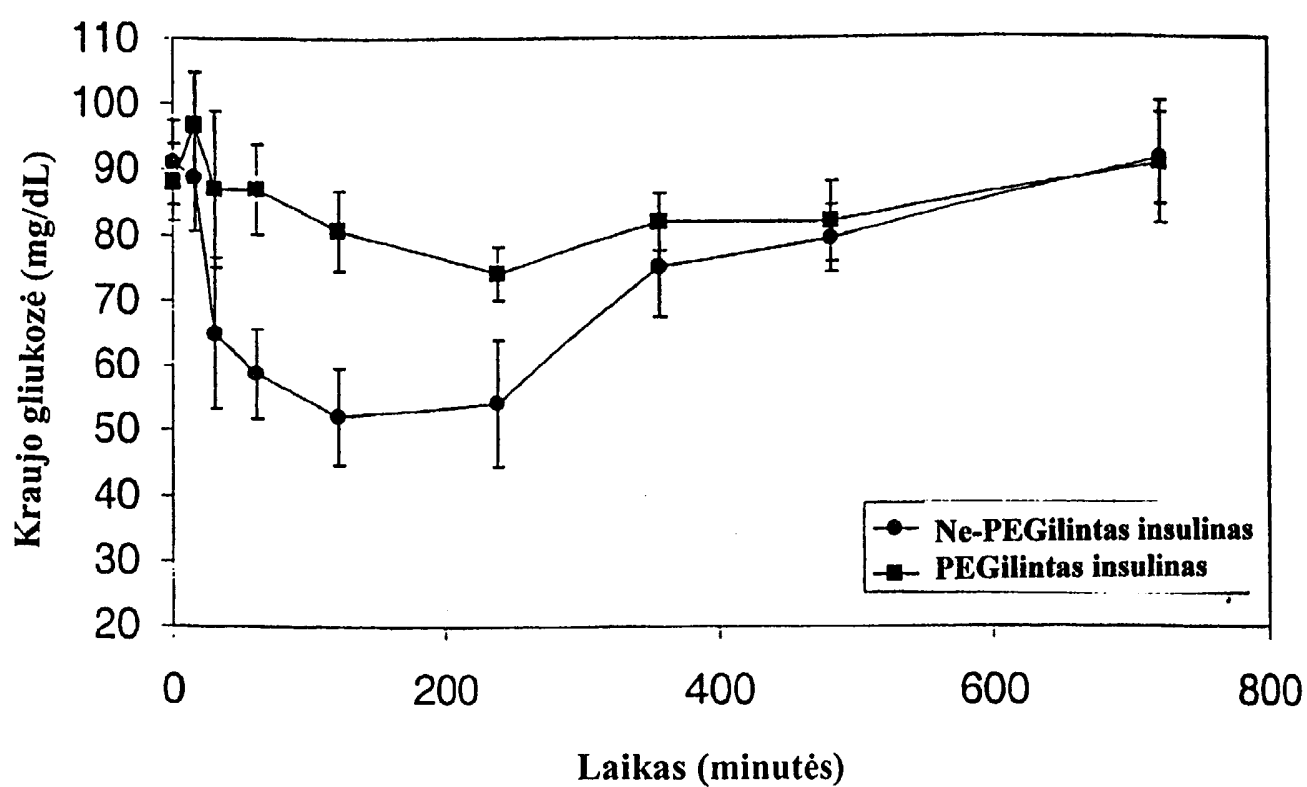


FIG. 5 5K PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms.
Vidutinės gliukozės koncentracijos kraujyje
(● = 40 μ g/gyvuliukui; ■ = 150 μ g/gyvuliukui)

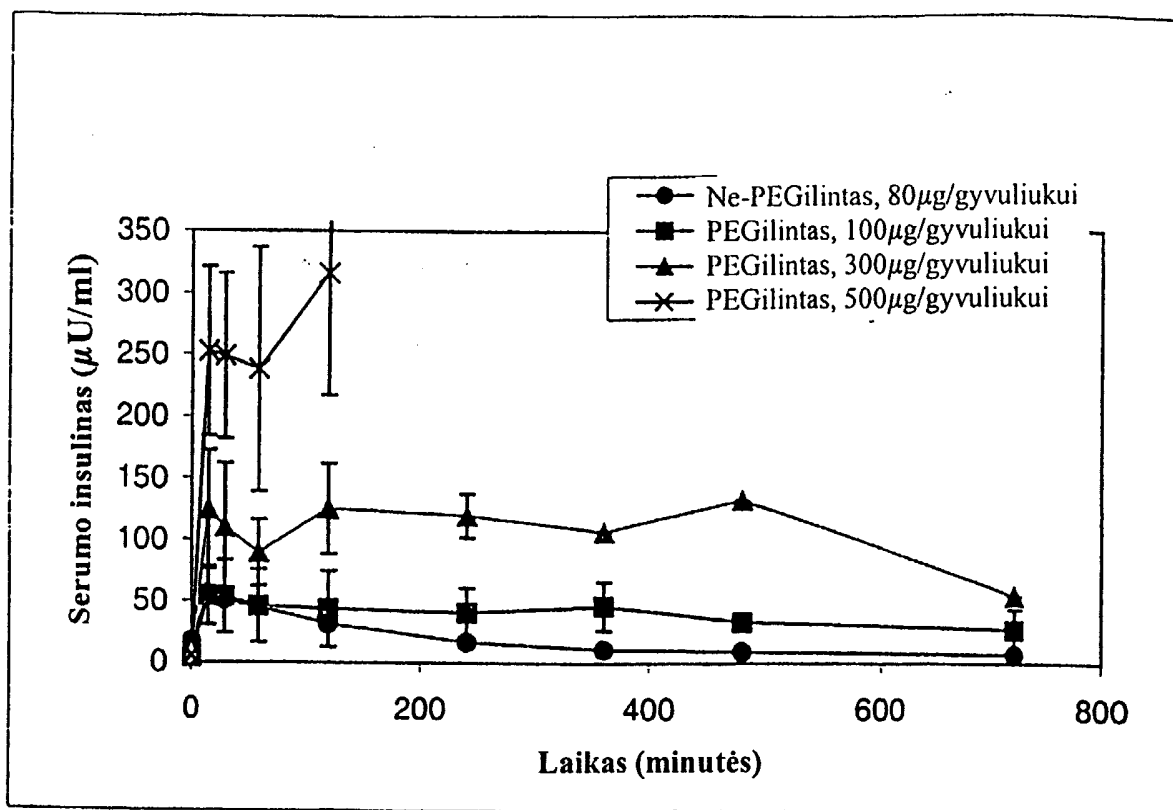


FIG. 6 750-1 PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms. Išlikimo serume kreivės

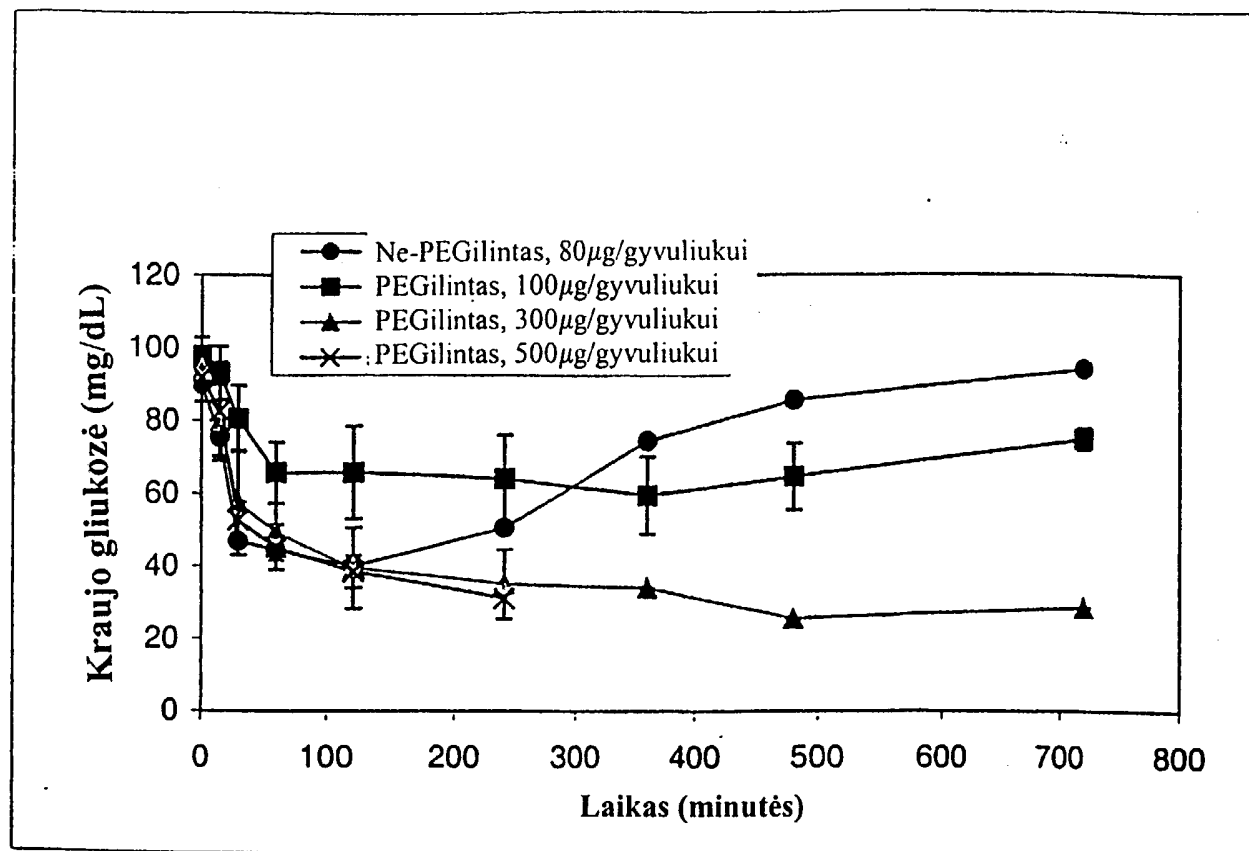


FIG. 7 750-1 PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms.
Vidutinės gliukozės koncentracijos kraujyje

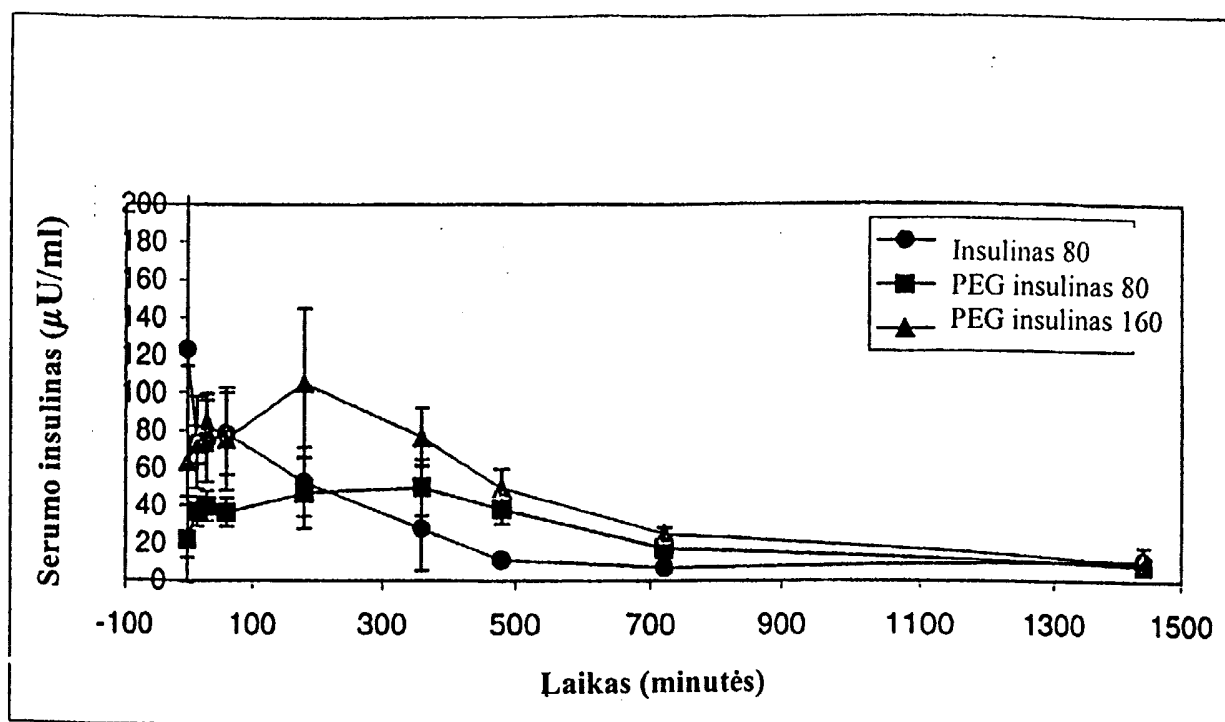


FIG. 8 750-1 PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms. Išlikimo serume kreivės

(● = 80 µg/gyvuliukui; ■ = 80 µg/gyvuliukui; ▲ = 160. µg/gyvuliukui)

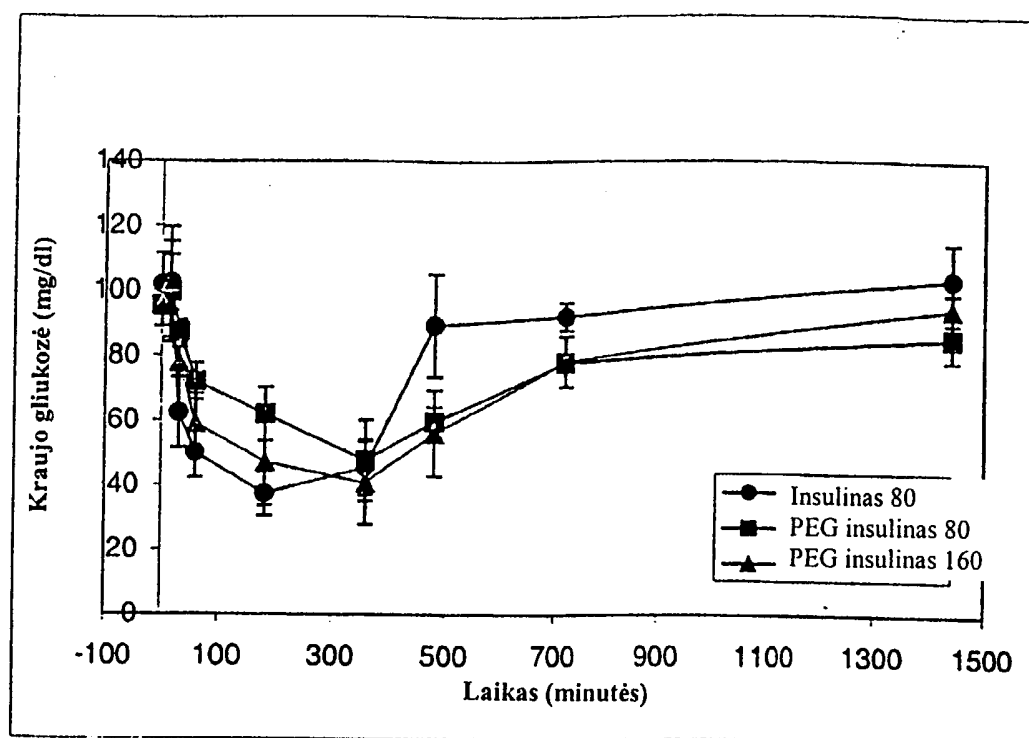


FIG. 9 750-1 PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms

(● = 80 μ g/gyvuliukui; ■ = 80 μ g/gyvuliukui; ▲ = 160 μ g/gyvuliukui)

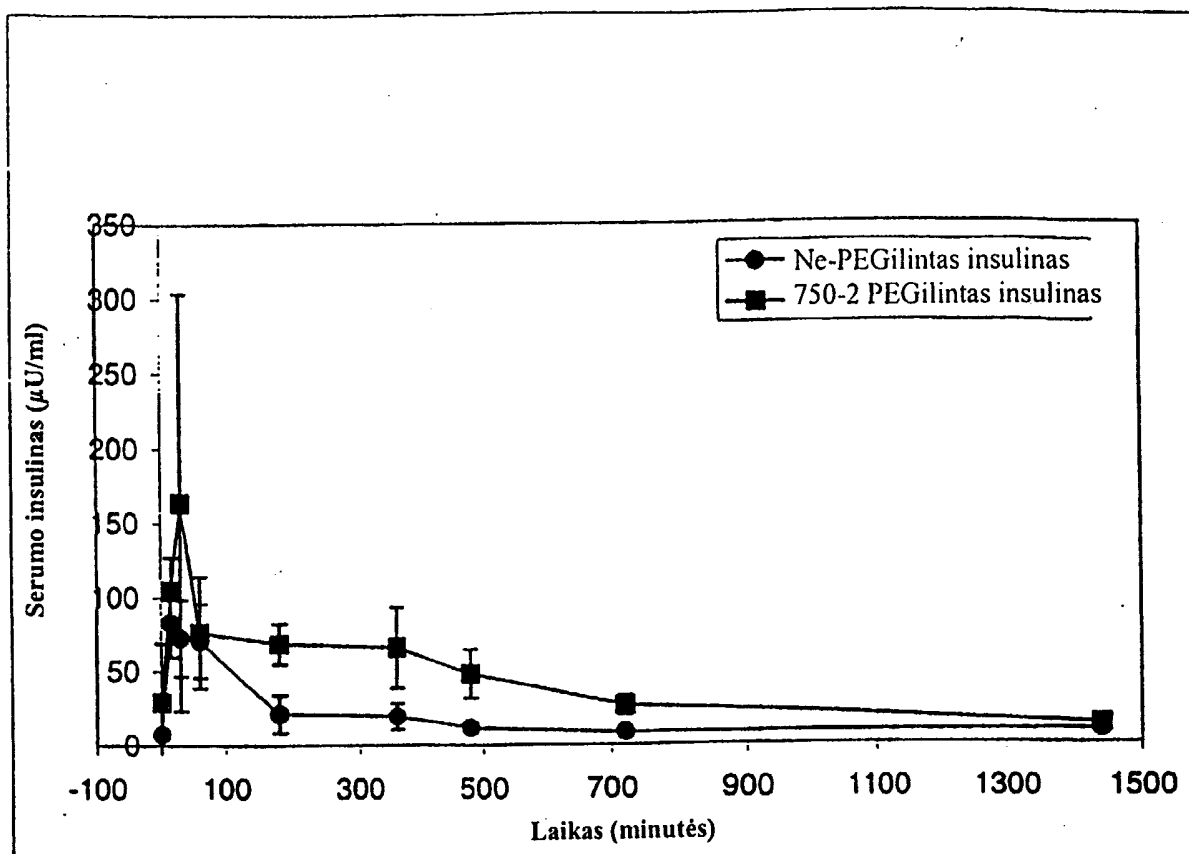


FIG. 10 750-2 PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms. Išlikimo serume kreivės

(● = 80 $\mu\text{g/gyvuliukui}$; ■ = 80 $\mu\text{g/gyvuliukui}$)

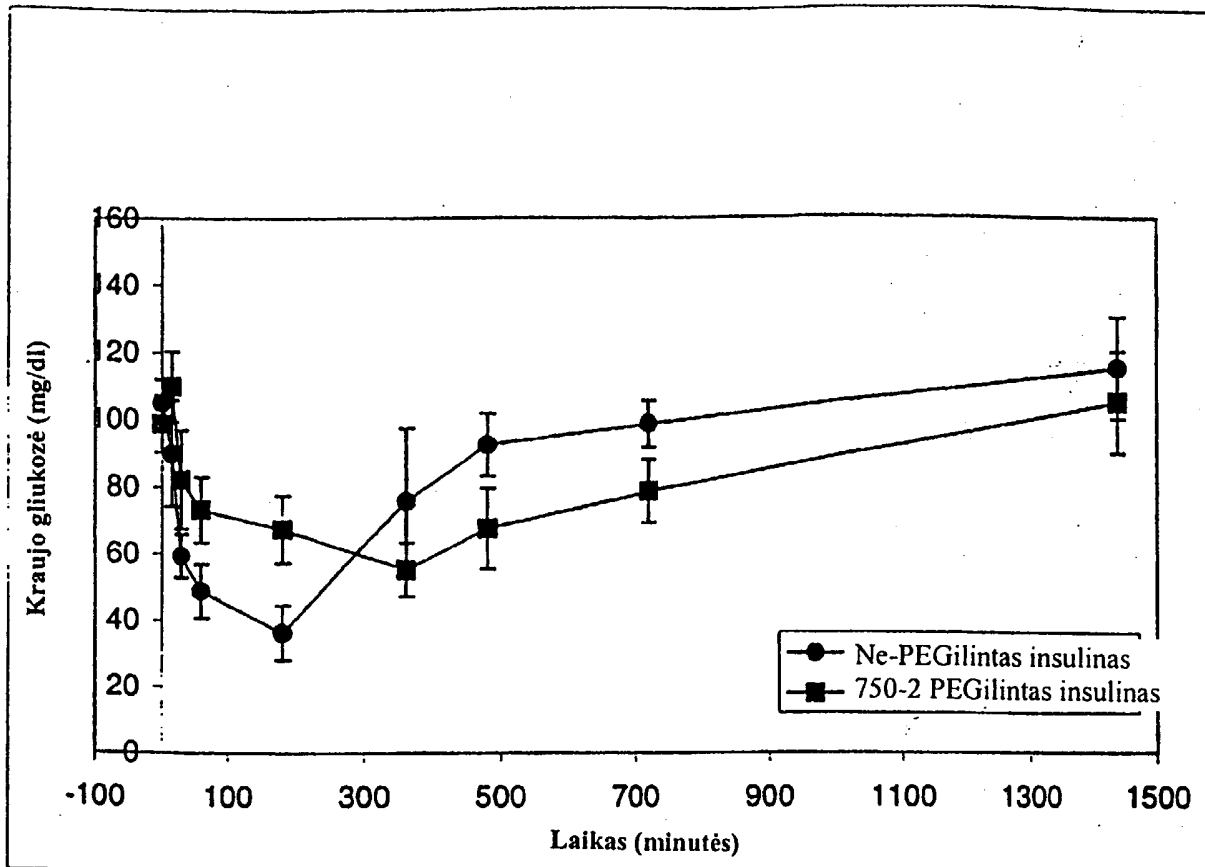


FIG. 11 750-2 PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms.
Vidutinės gliukozės koncentracijos kraujyje

● = 80 µg/gyvuliukui; ■ = 80 µg/gyvuliukui)

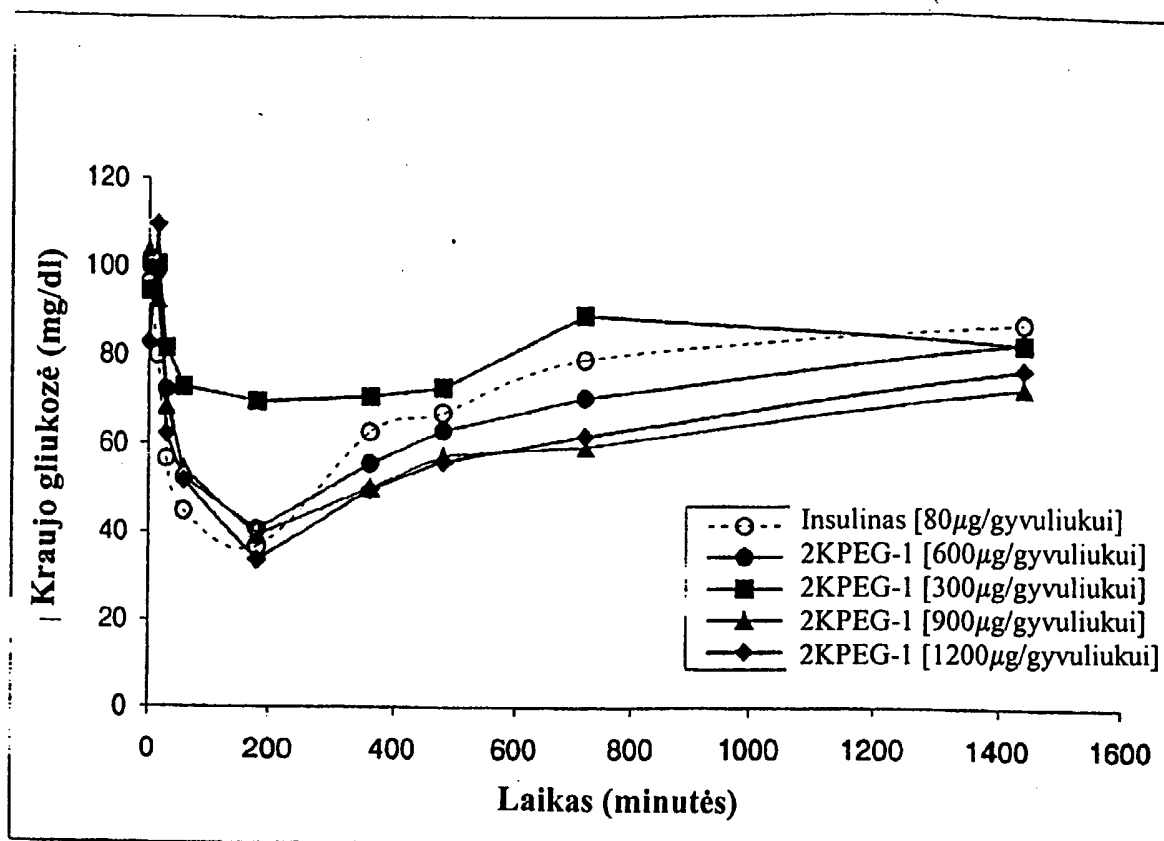


Fig. 12 2K PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms.
Vidutinės gliukozės koncentracijos kraujyje

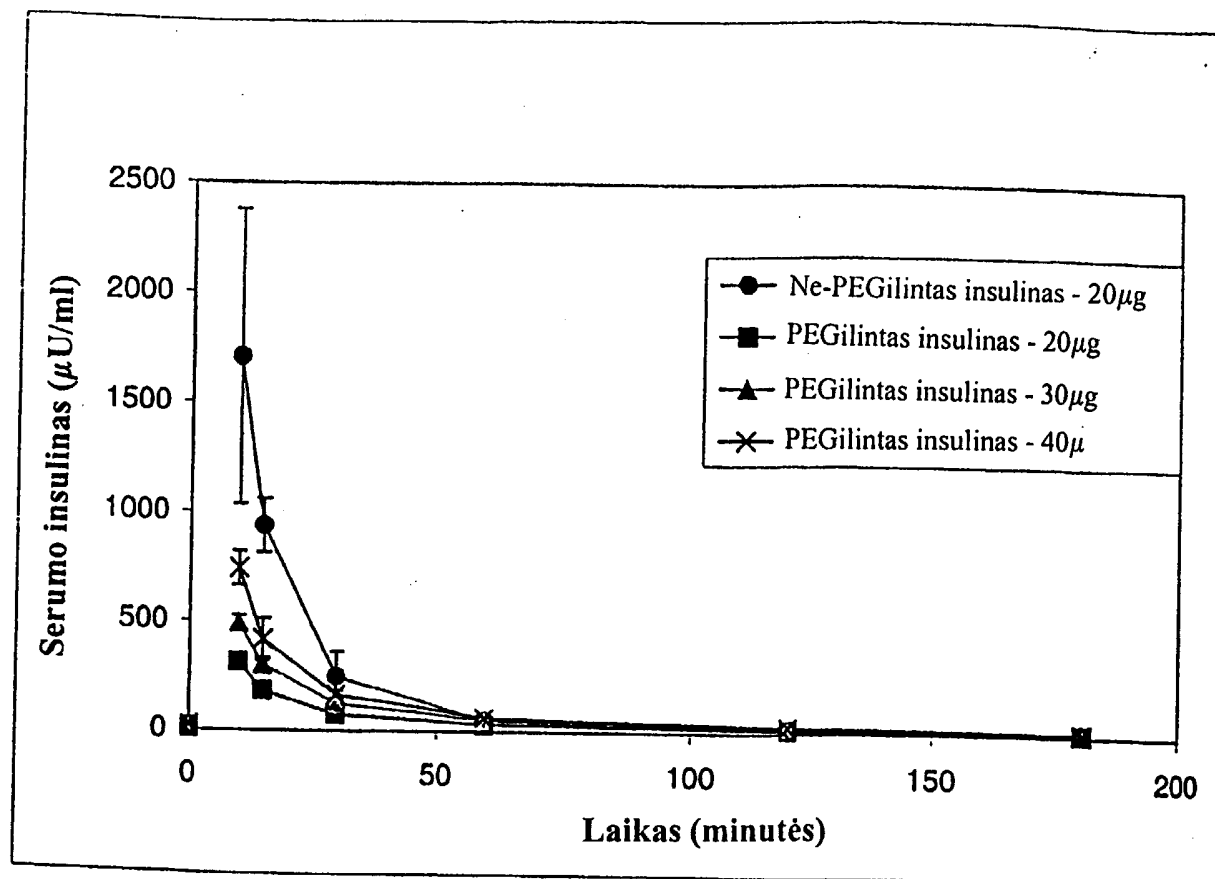


Fig. 13 2K PEG insulino i.v. įvedimas žiurkėms.
Išlikimo serume kreivės

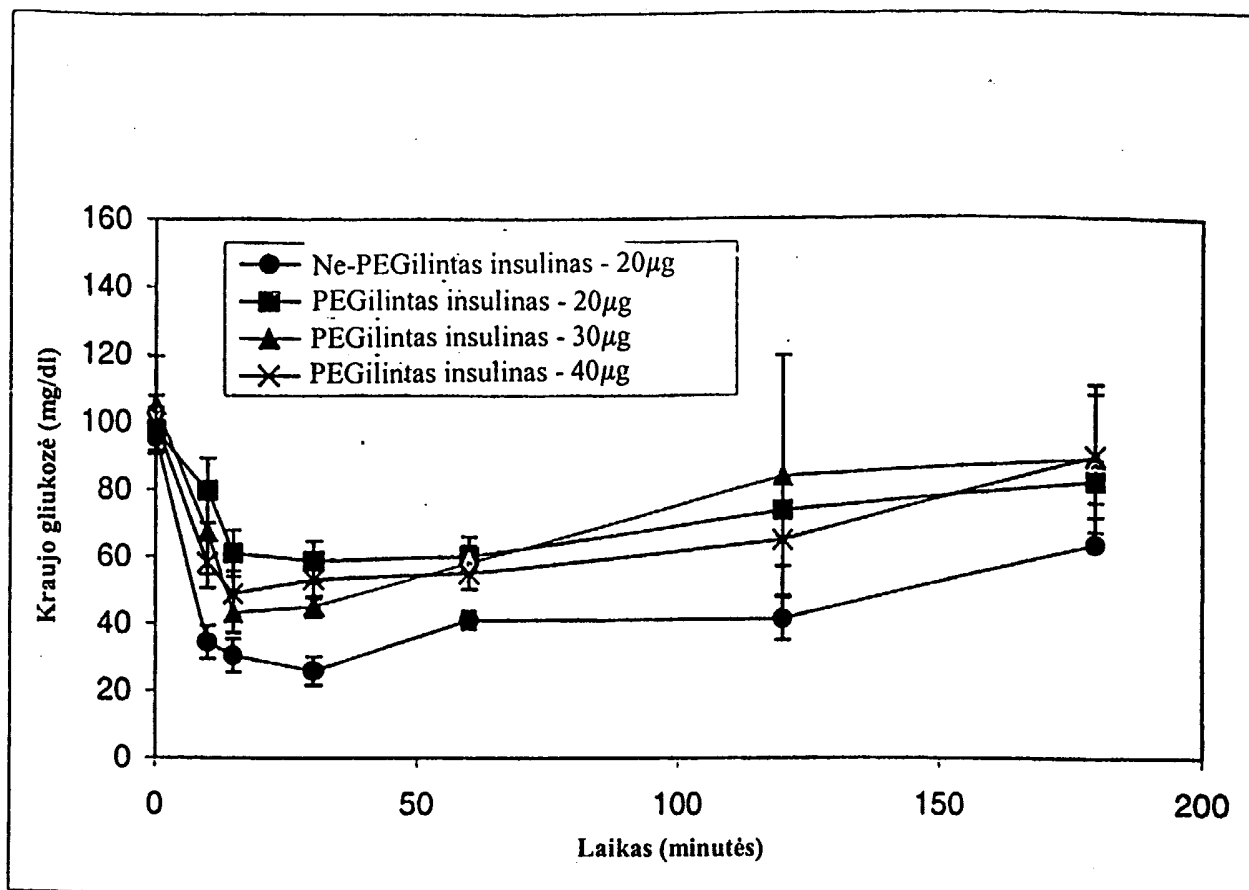


Fig. 14 2K PEG insulino i.t. įvedimas žiurkėms.
Vidutinės gliukozės koncentracijos kraulyje